

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/000790

International filing date: 21 January 2005 (21.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-014839  
Filing date: 22 January 2004 (22.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 20 May 2005 (20.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

21. 4. 2005

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2 0 0 4 年 1 月 2 2 日

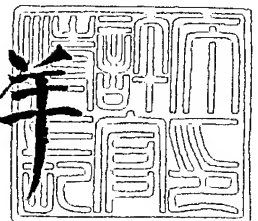
出 願 番 号  
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 0 1 4 8 3 9  
[ST. 10/C]: [ J P 2 0 0 4 - 0 1 4 8 3 9 ]

出 願 人  
Applicant(s): 独立行政法人科学技術振興機構

2 0 0 5 年 2 月 2 8 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川 洋



【書類名】 特許願  
【整理番号】 A181P84  
【提出日】 平成16年 1月22日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 C12N 15/00  
C12N 15/09  
【発明者】  
    【住所又は居所】 岡山県倉敷市有城 1 1 6 9 - 1 7 1  
    【氏名】 武田 和義  
【発明者】  
    【住所又は居所】 岡山県倉敷市有城 1 1 6 9 - 4 0  
    【氏名】 佐藤 和広  
【特許出願人】  
    【識別番号】 503360115  
    【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構  
【代理人】  
    【識別番号】 100080034  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 原 謙三  
    【電話番号】 06-6351-4384  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 003229  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1  
    【包括委任状番号】 0316432

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

ムギ類のゲノム DNA 中に存在し、赤カビ病抵抗性因子に連鎖する DNA マーカーであって、

赤カビ病抵抗性因子から約 0 ないし 9 センチモルガンの範囲内の距離に位置することを特徴とする DNA マーカー。

**【請求項 2】**

上記ムギ類がオオムギであることを特徴とする請求項 1 に記載の DNA マーカー。

**【請求項 3】**

上記ゲノム DNA が 2 H 染色体であることを特徴とする請求項 2 に記載の DNA マーカー。

**【請求項 4】**

配列番号 1 に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号 2 に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第一プライマーセットを用いて増幅されることを特徴とする請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の DNA マーカー。

**【請求項 5】**

上記赤カビ病抵抗性因子から約 0 センチモルガンの距離に位置することを特徴とする請求項 4 に記載の DNA マーカー。

**【請求項 6】**

配列番号 3 に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号 4 に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第二プライマーセットを用いて増幅されることを特徴とする請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の DNA マーカー。

**【請求項 7】**

上記赤カビ病抵抗性因子から約 0.6 センチモルガンの距離に位置することを特徴とする請求項 6 に記載の DNA マーカー。

**【請求項 8】**

配列番号 8 に示される塩基配列、または配列番号 9 に示される塩基配列を有する請求項 7 に記載の DNA マーカー。

**【請求項 9】**

上記ゲノム DNA が 5 H 染色体であることを特徴とする請求項 2 に記載の DNA マーカー。

**【請求項 10】**

配列番号 5 に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号 6 に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第三プライマーセットを用いて増幅されることを特徴とする請求項 1 または 2 または 9 に記載の DNA マーカー。

**【請求項 11】**

上記赤カビ病抵抗性因子から約 9 センチモルガンの距離に位置することを特徴とする請求項 10 に記載の DNA マーカー。

**【請求項 12】**

配列番号 10 に示される塩基配列、または配列番号 11 に示される塩基配列を有する請求項 11 に記載の DNA マーカー。

**【請求項 13】**

配列番号 5 に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号 7 に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第四プライマーセットを用いて増幅されることを特徴とする請求項 1 または 2 または 9 に記載の DNA マーカー。

**【請求項 14】**

上記赤カビ病抵抗性因子から約 9 センチモルガンの距離に位置することを特徴とする請求項 13 に記載の DNA マーカー。

**【請求項 15】**

配列番号 12 に示される塩基配列、または配列番号 13 に示される塩基配列を有する請

求項 14 に記載の DNA マーカー。

【請求項 16】

上記赤カビ病抵抗性因子から約 2.2 センチモルガンの距離に位置することを特徴とする請求項 9 に記載の DNA マーカー。

【請求項 17】

請求項 1 ないし 16 のいずれか 1 項に記載の DNA マーカーを用いて赤カビ病抵抗性因子を含む DNA 断片を単離することを特徴とする DNA 断片の単離方法。

【請求項 18】

請求項 17 に記載の単離方法により得られた赤カビ病抵抗性因子を含む DNA 断片を、植物のゲノム DNA に導入することを特徴とする赤カビ病抵抗性植物の生産方法。

【請求項 19】

上記植物がムギ類であることを特徴とする請求項 18 に記載の赤カビ病抵抗性植物の生産方法。

【請求項 20】

上記ムギ類がオオムギであることを特徴とする請求項 19 に記載の赤カビ病抵抗性植物の生産方法。

【請求項 21】

請求項 18 ないし 20 のいずれか 1 項に記載の赤カビ病抵抗性植物の生産方法によって得られた赤カビ病抵抗性植物。

【請求項 22】

請求項 1 ないし 16 のいずれか 1 項に記載の DNA マーカーのうち、少なくとも 1 つの DNA マーカーが基板上に固定されていることを特徴とする DNA マイクロアレイ。

【請求項 23】

植物のゲノム DNA 中から赤カビ病抵抗性因子に連鎖する DNA マーカーを検出する方法であって、

配列番号 1 に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号 2 に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第一プライマーセット、

配列番号 3 に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号 4 に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第二プライマーセット、

配列番号 5 に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号 6 に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第三プライマーセット、および

配列番号 5 に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号 7 に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第四プライマーセットのうち、

少なくとも 1 組のプライマーセットを用いて増幅される DNA を、赤カビ病抵抗性因子に連鎖する DNA マーカーとすることを特徴とする DNA マーカーの検出方法。

【請求項 24】

上記第一プライマーセットおよび第二プライマーセットのうちの少なくとも 1 組を用いるとともに、

上記第三プライマーセットおよび第四プライマーセットのうちの少なくとも 1 組を用いることを特徴とする請求項 23 に記載の DNA マーカーの検出方法。

【請求項 25】

上記植物がムギ類であることを特徴とする請求項 23 または 24 に記載の DNA マーカーの検出方法。

【請求項 26】

上記ムギ類がオオムギであることを特徴とする請求項 25 に記載の DNA マーカーの検出方法。

【請求項 27】

請求項 23 ないし 26 のいずれか 1 項に記載の DNA マーカーの検出方法により植物のゲノム DNA 中から検出される DNA マーカーのうち、少なくとも 1 つの DNA マーカーについて多型を検出することを特徴とする赤カビ病抵抗性因子の有無の判定方法。

**【請求項 28】**

請求項 23 ないし 26 のいずれか 1 項に記載の検出方法により植物のゲノム DNA 中から検出される DNA マーカーのうち、少なくとも 1 つの DNA マーカーについて多型を検出することを特徴とする赤カビ病抵抗性植物の判別方法。

**【請求項 29】**

配列番号 1 に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号 2 に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第一プライマーセット、

配列番号 3 に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号 4 に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第二プライマーセット、

配列番号 5 に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号 6 に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第三プライマーセット、および

配列番号 5 に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号 7 に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第四プライマーセットのうち、

少なくとも 1 組からなることを特徴とするプライマー群。

**【請求項 30】**

上記第一プライマーセットおよび第二プライマーセットのうちの少なくとも 1 組と、

上記第三プライマーセットおよび第四プライマーセットのうちの少なくとも 1 組とからなることを特徴とする請求項 29 記載のプライマー群。

**【請求項 31】**

赤カビ病抵抗性因子に連鎖する DNA マーカーについて多型を検出することにより、赤カビ病抵抗性因子の有無を判定する判定方法に用いられるキットであって、

DNA マーカーを増幅するためのプライマーセットとして、請求項 29 または 30 に記載のプライマー群を含むことを特徴とする、赤カビ病抵抗性因子の有無の判定キット。

**【請求項 32】**

赤カビ病抵抗性因子に連鎖する DNA マーカーについて多型を検出することにより、赤カビ病抵抗性植物を判別するために用いられるキットであって、

DNA マーカーを増幅するためのプライマーセットとして、請求項 29 または 30 に記載のプライマー群を含むことを特徴とする、赤カビ病抵抗性植物の判別キット。

【書類名】明細書

【発明の名称】赤カビ病抵抗性因子に連鎖するDNAマーカーおよびその利用

【技術分野】

【0001】

本発明はムギ類、特にオオムギのゲノムDNA中に存在し、かつ赤カビ病抵抗性を付与する遺伝子（以下赤カビ病抵抗性因子と称す）に連鎖するDNAマーカー、およびその利用に関するものである。

【背景技術】

【0002】

オオムギの赤カビ病は、オオムギの品質、収穫量を低下させるのみならず、人体にも有害なデオキシニバレノールなどのカビ毒を生じさせる重大な病害であることが知られている。現在、世界中でその感染が増加しているため、赤カビ病抵抗性品種の育成が強く望まれている。

【0003】

オオムギの赤カビ病は、*Fusarium graminearum* (フザリウム・グラミネアルム), *F. roseum* (フザリウム・ロゼウム), *F. culmorum* (フサリウム・クルモルム) 等の一般的にみられる腐生菌が原因となって起こる病害である。当該病原菌は、不完全世代においてイネ科雑草、稲ワラ、麦ワラ、地中の有機物などに腐生的に寄生しているが、温度や日長などの条件が整うと子のう殻を形成する。かかる子のう殻が、水にぬれて膨張・裂開すると子のう胞子が飛散してオオムギ等のムギ類に感染する。ムギ類への感染は、開花期前後の比較的短い期間に起こり、罹病性穂に形成される分生子が第2の感染源となって感染をさらに広げる。また分生子は粘物質を有するため、雨露によって懸濁液となって拡散し、さらに感染を拡大する。オオムギの赤カビ病の感染機構は、穎の中に残った葯の残骸や退化した組織を通じて最初の感染が起こり、菌糸が成長して穀粒に侵入するか、あるいは穎よりはみ出した葯を通じて侵入するなど、いずれにせよ葯がその感染に大きく関わっていることがわかっている。

【0004】

ところで、オオムギの中には、赤カビ病に対する抵抗性を有する品種が存在している。かかるオオムギの赤カビ病抵抗性品種の抵抗性機構について研究がなされ、条性・穂長・出穂時期・穂軸節間長等の形質の関与が示唆されている（例えば、非特許文献1ない5参照）。またオオムギには赤カビ病に対する免疫的抵抗性は無いとされ、比較的少数の遺伝子とその抵抗性に関与する量的性質であることがいわれている（例えば非特許文献6参照）。

【非特許文献1】Steffen BJ. 1998. "Fusarium head blight of barley: epidemic s, impact, and breeding for resistance." NBA Tech Quart 35: 177-184.

【非特許文献2】Stuchlakova E and Sip V. 1996. "Resistance of Czech and Slovak winter wheat varieties to Fusarium head blight." Genet a Slecht Praha (Genetics and plant Breeding) 32:79-94.

【非特許文献3】部田 英雄、日浦 運治. 1962. 「赤かび病に対する抵抗性の品種間差異. オオムギの耐病性に関する研究 第13報」農学研究 49: 177-187

【非特許文献4】武田 和義、部田 英雄. 1989. 「オオムギにおける赤かび病検定法の開発と耐病性品種の検索」育種学雑誌 39

【非特許文献5】Zhu, H., L. Gilchrist, P. Hayes, A. Kleinhofs, D. Kudruna, Z. Liu, L. Porm, B. Steffenson, T. Toojinda, P. Vivar. 1999. "Does function follow form? Principal QTLs for Fusarium head bright (FHB) resistance are coincident with QTLs for inflorescence traits and plant height in a doubled-ha ploide population of barley." Theor Appl Genet 99: 1221-1232.

【非特許文献6】堀 真雄. 1985. 「コムギおよびオオムギ赤かび病の発生生態と防除法」農業および園芸 60: 431-436

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0005】

オオムギの赤カビ病抵抗性品種の抵抗性機構について研究がなされているが、オオムギの赤カビ病抵抗性因子および抵抗性のメカニズムの詳細についてはいまだ明らかにされていない。

## 【0006】

ところで、上記赤カビ病抵抗性等の量的形質を司る遺伝子の解析方法として、近年 QTL (quantitative trait loci ; 量的形質遺伝子座) 解析が行なわれている。かかる QTL 解析は、染色体上のどの領域が目的とする量的形質に影響しているかを統計的に解析し、その領域の近傍にある DNA マーカーを見いだすことにより行なう。見いだされた DNA マーカーにより作成された遺伝地図 (連鎖地図) 情報を元に、目的形質に影響を与えている領域を絞り込んでいき、最終的にその遺伝子を特定・単離することができる。かかる手法は動物・植物を問わず広範な分野で有効に用いられており、例えばイネの出穂に關与する遺伝子が単離・同定されている。

## 【0007】

そこで本発明は上記課題に鑑みてなされたものであり、その目的は、オオムギのゲノム DNA 中に存在し、かつ赤カビ病抵抗性因子に連鎖する DNA マーカーを見いだすことによって、オオムギの赤カビ病抵抗性因子の単離、オオムギ赤カビ病抵抗性のメカニズム解明、赤カビ病抵抗性植物 (例えばオオムギをはじめとするムギ類) の育種、および赤カビ病抵抗性植物 (例えばオオムギをはじめとするムギ類) の判別法等その利用方法を提供することにある。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0008】

本発明者等は、上記課題を解決すべく、赤カビ病に対する抵抗性が大きく異なるオオムギ品種 Russia 6 (二条、抵抗性) と H.E.S. 4 (六条、罹病性) の交配から育種した組み換え近交系統 (RI 系統) を材料として、赤カビ病抵抗性にかかわる QTL 解析を行なった。

## 【0009】

その結果、赤カビ病抵抗性に関する QTL を 2H 染色体上に 2 つ、5H 染色体上に 1 つ検出した。ただし 2H 染色体で検出された QTL のうち 1 つは、公知の条性遺伝子 (vrs1) の位置と一致したことより、vrs1 遺伝子の多発現の可能性が示唆された。よってそれ以外の赤カビ病抵抗性に関する QTL に着目して解析を進め、これら QTL にそれぞれ連鎖する DNA マーカーを見だし、本発明を完成させるに至った。

## 【0010】

すなわち本発明は、以下の発明を包含する。

## 【0011】

(1) ムギ類のゲノム DNA 中に存在し、赤カビ病抵抗性因子に連鎖する DNA マーカーであって、

赤カビ病抵抗性因子から約 0 ないし 9 センチモルガンの範囲内の距離に位置することを特徴とする DNA マーカー。

## 【0012】

(2) 上記ムギ類がオオムギであることを特徴とする (1) に記載の DNA マーカー。

## 【0013】

(3) 上記ゲノム DNA が 2H 染色体であることを特徴とする (2) に記載の DNA マーカー。

## 【0014】

(4) 配列番号 1 に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号 2 に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第一プライマーセットを用いて増幅されることを特徴とする (1) ないし (3) のいずれかに記載の DNA マーカー。



## 【0015】

(5) 上記赤カビ病抵抗性因子から約0センチモルガンの距離に位置することを特徴とする(4)に記載のDNAマーカー。

## 【0016】

(6) 配列番号3に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号4に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第二プライマーセットを用いて増幅されることを特徴とする(1)ないし(3)のいずれかに記載のDNAマーカー。

## 【0017】

(7) 上記赤カビ病抵抗性因子から約0.6センチモルガンの距離に位置することを特徴とする(6)に記載のDNAマーカー。

## 【0018】

(8) 配列番号8に示される塩基配列、または配列番号9に示される塩基配列を有する(7)に記載のDNAマーカー。

## 【0019】

(9) 上記ゲノムDNAが5H染色体であることを特徴とする(2)に記載のDNAマーカー。

## 【0020】

(10) 配列番号5に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号6に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第三プライマーセットを用いて増幅されることを特徴とする(1)または(2)または(9)に記載のDNAマーカー。

## 【0021】

(11) 上記赤カビ病抵抗性因子から約9センチモルガンの距離に位置することを特徴とする(10)に記載のDNAマーカー。

## 【0022】

(12) 配列番号10に示される塩基配列、または配列番号11に示される塩基配列を有する(11)に記載のDNAマーカー。

## 【0023】

(13) 配列番号5に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号7に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第四プライマーセットを用いて増幅されることを特徴とする(1)または(2)または(9)に記載のDNAマーカー。

## 【0024】

(14) 上記赤カビ病抵抗性因子から約9センチモルガンの距離に位置することを特徴とする(13)に記載のDNAマーカー。

## 【0025】

(15) 配列番号12に示される塩基配列、または配列番号13に示される塩基配列を有する(14)に記載のDNAマーカー。

## 【0026】

(16) 上記赤カビ病抵抗性因子から約2.2センチモルガンの距離に位置することを特徴とする(9)に記載のDNAマーカー。

## 【0027】

(17) 上記(1)ないし(16)のいずれかのDNAマーカーを用いて赤カビ病抵抗性因子を含むDNA断片を単離することを特徴とするDNA断片の単離方法。

## 【0028】

(18) 上記(17)の単離方法により得られた赤カビ病抵抗性因子を含むDNA断片を、植物のゲノムDNAに導入することを特徴とする赤カビ病抵抗性植物の生産方法。

## 【0029】

(19) 上記植物がムギ類であることを特徴とする(18)に記載の赤カビ病抵抗性植物の生産方法。

## 【0030】

(20) 上記ムギ類がオオムギであることを特徴とする(19)に記載の赤カビ病抵抗

性植物の生産方法。

【0031】

(21) 上記(18)ないし(20)のいずれかの赤カビ病抵抗性植物の生産方法によって得られた赤カビ病抵抗性植物。

【0032】

(22) 上記(1)ないし(16)のいずれかのDNAマーカーのうち、少なくとも1つのDNAマーカーが基板上に固定されていることを特徴とするDNAマイクロアレイ。

【0033】

(23) 植物のゲノムDNA中から赤カビ病抵抗性因子に連鎖するDNAマーカーを検出する方法であって、

配列番号1に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号2に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第一プライマーセット、

配列番号3に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号4に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第二プライマーセット、

配列番号5に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号6に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第三プライマーセット、および

配列番号5に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号7に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第四プライマーセットのうち、

少なくとも1組のプライマーセットを用いて増幅されるDNAを、赤カビ病抵抗性因子に連鎖するDNAマーカーとすることを特徴とするDNAマーカーの検出方法。

【0034】

(24) 上記第一プライマーセットおよび第二プライマーセットのうちの少なくとも1組を用いるとともに、

上記第三プライマーセットおよび第四プライマーセットのうちの少なくとも1組を用いることを特徴とする(23)に記載のDNAマーカーの検出方法。

【0035】

(25) 上記植物がムギ類であることを特徴とする(23)または(24)に記載のDNAマーカーの検出方法。

【0036】

(26) 上記ムギ類がオオムギであることを特徴とする(25)に記載のDNAマーカーの検出方法。

【0037】

(27) 上記(23)ないし(26)のいずれかの検出方法により植物のゲノムDNA中から検出されるDNAマーカーのうち、少なくとも1つのDNAマーカーについて多型を検出することを特徴とする赤カビ病抵抗性因子の有無の判定方法。

【0038】

(28) 上記(23)ないし(26)のいずれかのDNAマーカーの検出方法により植物のゲノムDNA中から検出されるDNAマーカーのうち、少なくとも1つのDNAマーカーについて多型を検出することを特徴とする赤カビ病抵抗性植物の判別方法。

【0039】

(29) 配列番号1に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号2に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第一プライマーセット、

配列番号3に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号4に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第二プライマーセット、

配列番号5に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号6に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第三プライマーセット、および

配列番号5に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号7に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第四プライマーセットのうち、

少なくとも1組からなることを特徴とするプライマー群。

【0040】

(30) 上記第一プライマーセットおよび第二プライマーセットのうちの少なくとも1組と、

上記第三プライマーセットおよび第四プライマーセットのうちの少なくとも1組とからなることを特徴とする(29)記載のプライマー群。

【0041】

(31) 赤カビ病抵抗性因子に連鎖するDNAマーカーについて多型を検出することにより、赤カビ病抵抗性因子の有無を判定する判定方法に用いられるキットであって、

DNAマーカーを増幅するためのプライマーセットとして、(29)または(30)に記載のプライマー群を含むことを特徴とする、赤カビ病抵抗性因子の有無の判定キット。

【0042】

(32) 赤カビ病抵抗性因子に連鎖するDNAマーカーについて多型を検出することにより、赤カビ病抵抗性植物を判別するために用いられるキットであって、

DNAマーカーを増幅するためのプライマーセットとして、(29)または(30)に記載のプライマー群を含むことを特徴とする、赤カビ病抵抗性植物の判別キット。

【0043】

上記(1)ないし(16)のDNAマーカーは、ムギ類(オオムギ)のゲノムDNA中に存在し、かつ赤カビ病抵抗性因子に連鎖している。つまり該DNAマーカーと赤カビ病抵抗性因子間で分離して組み換えが起こる確率は低い。それゆえ上記DNAマーカーを用いることによって、例えば赤カビ病抵抗性因子を含むDNA断片の取得、赤カビ病抵抗性因子の有無の判定、赤カビ病抵抗性植物(例えばオオムギをはじめとするムギ類)の判別等を行なうことが可能となる。

【0044】

上記(17)の赤カビ病抵抗性因子を含むDNA断片の単離方法は、上記(1)ないし(16)のいずれかのDNAマーカーを用いて該DNA断片を単離することよりなる。上記DNAマーカーは、赤カビ病抵抗性因子に連鎖しているため、上記DNAを目標にクローニングを行なえば、目的とするDNA断片を容易に単離することが可能となる。

【0045】

上記(18)ないし(20)のいずれかの赤カビ病抵抗性植物の生産方法は、上記赤カビ病抵抗性因子を含むDNA断片を植物(ムギ類、オオムギ)のゲノムDNA中に導入することよりなる。赤カビ病抵抗性因子は、赤カビ病に対する抵抗性を付与する特性を有する遺伝子であるため、赤カビ病に対して罹病性の植物(ムギ類、オオムギ)に抵抗性を付与、または抵抗性を増強することが可能となる。

【0046】

上記(21)の赤カビ病抵抗性植物は、上記赤カビ病抵抗性植物の生産方法によって得られた植物(ムギ類、オオムギ)である。それゆえ赤カビによる病害を防止することができ、該植物(ムギ類、オオムギ)の収穫量の向上、品質の向上等を図ることができる。

【0047】

上記(22)のDNAマイクロアレイは、(1)ないし(16)に記載のDNAマーカーが基板上に固定されていることよりなる。かかるDNAマイクロアレイによれば、1回の試行で複数のDNAマーカーの検出が可能となり、少ない労力でより大量の試料をより短時間で処理することが可能となる。

【0048】

上記(23)のDNAマーカーの検出方法において、第一プライマーセットまたは、第二プライマーセットを用いて増幅反応を行なえば2H染色体中に存在する赤カビ病抵抗性因子に連鎖するDNAマーカーを検出することが可能であり、第三プライマーセットまたは第四プライマーセットを用いて増幅反応を行なえば5H染色体中に存在する赤カビ病抵抗性因子に連鎖するDNAマーカーを検出することが可能である。

【0049】

また(24)に記載のDNAマーカーの検出方法によれば、上記第一プライマーセットおよび第二プライマーセットのうちの少なくとも1組を用いるとともに、上記第三プライ

マーセットまたは第四プライマーセットのうちの少なくとも1組を用いることよりなるため、2H染色体中に存在する赤カビ病抵抗性因子に連鎖するDNAマーカー、および5H染色体中に存在する赤カビ病抵抗性因子に連鎖するDNAマーカーをともに検出することが可能となる。

#### 【0050】

なお上記(25)または(26)に記載のDNAマーカーの検出方法は、上記(23)または(24)の検出方法をムギ類またはオオムギに適用することよりなる。検出する上記DNAマーカーは、オオムギをはじめとするムギ類のゲノムDNA中に存在し赤カビ病抵抗性因子に連鎖しているため、当該DNAマーカーの検出方法はオオムギをはじめとするムギ類に好適に用いることができる。

#### 【0051】

上記(27)の赤カビ病抵抗性因子の有無判定方法は、上記(23)ないし(26)のいずれかの検出方法により植物のゲノムDNA中から検出されるDNAマーカーのうち、少なくとも1つのDNAマーカーについて多型(赤カビ病抵抗性型か赤カビ病罹病性型か)を検出することによって、試験対象植物(例えばオオムギをはじめとするムギ類)中の赤カビ病抵抗性因子の有無を判断している。該DNAマーカーは赤カビ病抵抗性因子に連鎖しているため、該マーカーの型を指標とすれば、高確率で赤カビ病抵抗性因子の有無を判定することが可能となる。

#### 【0052】

上記(28)の赤カビ病抵抗性植物の判別方法は、上記(23)ないし(26)のいずれかの検出方法により植物のゲノムDNA中から検出されるDNAマーカーのうち、少なくとも1つのDNAマーカーについて多型(赤カビ病抵抗性型か赤カビ病罹病性型か)を検出することによって、試験対象植物(例えばオオムギをはじめとするムギ類)が赤カビ病抵抗性植物(例えばオオムギをはじめとするムギ類)か否かを判別している。該DNAマーカーは赤カビ病抵抗性因子に連鎖しているため、該マーカーの型を指標とすれば、高確率で赤カビ病抵抗性植物か否かを判別することが可能となる。

#### 【0053】

上記(29)または(30)のプライマー群は、2H染色体中に存在する赤カビ病抵抗性因子に連鎖するDNAマーカーの検出、および/または5H染色体中に存在する赤カビ病抵抗性因子に連鎖するDNAマーカーの検出に用いることが可能となり、上記赤カビ病抵抗性因子の有無の判定、赤カビ病抵抗性植物(例えばオオムギをはじめとするムギ類)の判別等に利用が可能である。

#### 【0054】

上記(31)に記載の赤カビ病抵抗性因子の有無判定キットは、2H染色体中に存在する赤カビ病抵抗性因子に連鎖するDNAマーカーの増幅、および/または5H染色体中に存在する赤カビ病抵抗性因子に連鎖するDNAマーカーの増幅に用いるためのプライマーが含まれてなる。それゆえ試験対象植物中の赤カビ病抵抗性因子の有無の判定をより簡便に行なうことが可能となる。

#### 【0055】

上記(32)に記載の赤カビ病抵抗性植物の判別キットは、2H染色体中に存在する赤カビ病抵抗性因子に連鎖するDNAマーカーの増幅、および/または5H染色体中に存在する赤カビ病抵抗性因子に連鎖するDNAマーカーの増幅に用いるためのプライマーが含まれてなる。それゆえ試験対象植物(例えばオオムギをはじめとするムギ類)が、赤カビ病抵抗性植物(例えばオオムギをはじめとするムギ類)か否かの判別をより簡便に行なうことが可能となる。

#### 【発明の効果】

#### 【0056】

本発明にかかる赤カビ病抵抗性因子に連鎖するDNAマーカーおよびその利用によれば、赤カビ病抵抗性因子を含むDNA断片を単離することができる。それゆえ当該DNA断片を用いることによってオオムギの赤カビ病抵抗性に関与する遺伝子、および赤カビ病抵

抗性のメカニズム等の解明を行なうことが可能となるという効果を奏する。

【0057】

また、赤カビ病抵抗性を有する植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）または赤カビ病抵抗性がより増強された植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）を生産することができる。それゆえ食用作物として重要なオオムギの赤カビ病によるオオムギの収穫量の低下、および品質低下等の被害を減少させることが可能となるという効果を奏する。

【0058】

さらには、赤カビ病抵抗性植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）の育種の際の有効なスクリーニング手段を提供することができ、当該育種が容易となるという効果を奏する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0059】

本発明の実施の一形態について説明すれば、以下のとおりである。なお、本発明はこれに限定されるものではない。

【0060】

本発明は、赤カビ病抵抗性因子に連鎖するDNAマーカーおよびその利用の一例に関するものである。以下それぞれについて説明を加える。

【0061】

〔1. 本発明にかかるDNAマーカー〕

本発明にかかるDNAマーカーは、ムギ類（例えばオオムギ）のゲノムDNA中に存在し、赤カビ病抵抗性因子に連鎖している。

【0062】

なお本発明においてムギ類とは、例えばオオムギ、コムギ、ライムギ、ライコムギ、エンバク等を意味する。

【0063】

<1-1. 赤カビ病および赤カビ病抵抗性因子>

「赤カビ病」とは、前述のとおりフザリウム属菌類がムギ類に感染して起こる病害である。該赤カビ病は、登熟不良・減収を引き起こすばかりでなく、カビ毒（例えば、デオキシニバレノール）を生産し、発病したムギを食用・飼料にすると中毒症状を起こすという重大な病害である。

【0064】

オオムギには、かかる赤カビ病に対して抵抗性を示す品種が存在している。赤カビ病抵抗性の詳細なメカニズムは明らかにされていないが、これまでの研究によって、条性・穂長・出穂時期・穂軸節間長等の形質の関与が示唆されている。またオオムギには赤カビ病に対する免疫的抵抗性は無いとされ、比較的少数の遺伝子とその抵抗性に関与する量的形質であることがいわれている。このようにオオムギのゲノムDNA中に存在し、赤カビ病に対する抵抗性を付与する特性を有する遺伝子のことを本発明において「赤カビ病抵抗性因子」という。

【0065】

赤カビ病抵抗性因子の検索の手段としては、QTL解析が好適である。上述したごとく、発明者等は該赤カビ病抵抗性因子を検索するため、オオムギの赤カビ病抵抗性に関するQTL解析を行なっている。具体的には、以下のとおりである。材料としては、赤カビ病に対する抵抗性が大きく異なるオオムギ品種Russia6（二条、抵抗性）とH.E.S.4（六条、罹病性）の交配から育種した組み換え近交系統（RI系統）を用いて行なっている。また赤カビ病抵抗性の評価方法は、「切り穂検定法」（非特許文献4参照）を改変した0（抵抗性）～10（罹病性）のスコアで評価している。また解析のアルゴリズムには、simple interval mapping（SIM）とcomposite interval mapping（CIM）を用い、解析ソフトウェアにはそれぞれ、MAPMAKER/QTLとQTL Cartographerを用いて行なっている。

【0066】

かかるQTL解析の結果、オオムギの2H染色体上に2つ、5H染色体上に1つの赤カビ病抵抗性に関するQTLが検出されている。オオムギの2H染色体で検出されたQTLのうち1つは、公知の条性遺伝子(vrs1)の位置と一致したことより、vrs1遺伝子の多発現の可能性が示唆されている。この結果は、これまでの赤カビ病抵抗性に対する条性の関与を支持する結果である。しかし上記vrs1遺伝子が存在するQTL以外の遺伝子座に存在するであろう赤カビ病抵抗性因子については未知であり、条性遺伝子以外の赤カビ病抵抗性因子が存在しているものと考えられる。ここで特にオオムギの2H染色体上に存在しvrs1遺伝子の位置とは異なる遺伝子座に存在する赤カビ病抵抗性因子を「2H-2因子」と命名し、オオムギの5H染色体上に座乗するそれを「5H-1因子」と命名する。なお、オオムギの2H染色体上に存在しvrs1遺伝子の位置と一致した赤カビ病抵抗性因子を便宜上「2H-1因子」と称する。

#### 【0067】

##### <1-2. DNAマーカー>

発明者等が作成した高密度連鎖地図の情報を元に、上記赤カビ病抵抗性因子2H-2因子、5H-1因子の遺伝子座の近傍に位置するDNAマーカーを検索し、特に上記赤カビ抵抗因子に強連鎖するDNAマーカー、すなわち本発明にかかるDNAマーカーを発見するに至った。また該DNAマーカーのクローニングを行なってSTS化し、その情報からそれぞれのDNAマーカーを増幅するためのプライマーを設計した。

#### 【0068】

より具体的には、2H-2因子に連鎖するDNAマーカーとしてMM314、FM677を発見した。

#### 【0069】

MM314は、  
AGAGATCCCTGCTCAGCTTG (配列番号1) に示される塩基配列を有するプライマー、  
およびTCGTATTAAAGGCCGCATAGG (配列番号2) に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第一プライマーセットを用いてオオムギゲノムDNAを鋳型として増幅されるDNAマーカーであり、2H-2因子から約0センチモルガン(以下cMと表示する)の距離に位置している、つまり2H-2因子にほぼオーバーラップする位置に座乗するものである。

#### 【0070】

またFM677は、  
GCACGTAGCGTTCAACATCA (配列番号3) に示される塩基配列を有するプライマー、  
およびAACTTTTCCCAACCCTTTCC (配列番号4) に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第二プライマーセットを用いてオオムギゲノムDNAを鋳型として増幅されるDNAマーカーであり、2H-2因子から約0.6cMの距離に座乗するものである。

#### 【0071】

また上記第二のプライマーセットを用いて増幅されるFM677には、赤カビ病に対して抵抗性型と罹病性型が存在し、それぞれの塩基配列は配列番号8および配列番号9に示されるものである。

#### 【0072】

一方、5H-1因子に連鎖するDNAマーカーとしてFM426、MM1057を発見した。

#### 【0073】

FM426は、  
CCGTGTGTCGTCTAGGTCAA (配列番号5) に示される塩基配列を有するプライマー、  
およびCAACTTTGGTGGGACGTAGG (配列番号6) に示される塩基配列を

有するプライマーとの組み合わせである第三プライマーセット

または

CCGTGTGTCTAGGTC A A (配列番号5) に示される塩基配列を有するプライマー、

およびGGAAGAGTGATGGCGAAAC (配列番号7) に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第四プライマーセットを用いてオオムギゲノムDNAを鋳型として増幅されるDNAマーカーであり、5H-1因子から約9 cMの距離に座乗するものである。

【0074】

また上記第三のプライマーセットを用いて増幅されるFM426には、赤カビ病に対して抵抗性型と罹病性型が存在し、それぞれの塩基配列は配列番号10および配列番号11に示されるものである。

【0075】

また上記第四のプライマーセットを用いて増幅されるFM426には、赤カビ病に対して抵抗性型と罹病性型が存在し、それぞれの塩基配列は配列番号12および配列番号13に示されるものである。

【0076】

またMM1057は、5H-1因子から約2.2 cMの距離に座乗するものである。

【0077】

上記DNAマーカーと赤カビ病耐性因子(2H-2因子、5H-1因子)との位置関係を図1に示す。図1(a)には2H染色体上のDNAマーカーおよび2H-2因子の位置関係を示し、図1(b)には5H染色体上のDNAマーカーおよび5H-1因子の位置関係を示している。なお、図中左側は染色体上の短腕(5'端)を示し、右側は長腕(3'端)を示す。また2H-2因子または5H-1因子の座から短腕側にあるDNAマーカーの位置をマイナス値で示し、長腕側にあるDNAマーカーの位置をプラス値で示す。

【0078】

図1(a)によるとMM314は2H-2因子とほぼオーバーラップする位置(約0 cM)に座乗し、FM677は2H-2因子に対して長腕側に約0.6 cMの位置に座乗していることがわかる。一方、図1(b)によるとFM426は5H-1因子に対して短腕側に約9 cMの位置(約-9 cM)に座乗し、MM1057は5H-1因子に対して長腕側に約2.2 cMの位置に座乗していることがわかる。

【0079】

ここで、モルガン(M)について説明する。1モルガン(M)とは、減数分裂1回あたり平均1回の交叉を起こす染色体上の距離の単位である。例えば、2.2 cMは、赤カビ病抵抗性因子とDNAマーカーとの間で染色分体あたり平均して1000分の22回組み換えが起こることを示している。すなわちこの時は、2.2%の組み換え率であることを示している。

【0080】

ところで、増幅に際して鋳型として用いられるゲノムDNAは、オオムギの植物体より従来公知の方法で抽出可能である。具体的には、植物体からゲノムDNAを抽出するための一般法(Murray, M.G. and W.F. Thompson(1980) Nucleic Acids Res. 8:4321-4325. など参照)が好適な例として挙げられる。また、上記のゲノムDNAは、根、茎、葉、生殖器官など、オオムギの植物体を構成するいずれの組織を用いても抽出可能である。また、場合によってはオオムギのカルスから抽出してもよい。なお、上記生殖器官には、花器官(雄性・雌性生殖器官を含む)や種子も含まれる。ゲノムDNAの抽出は、例えば、オオムギの芽生え期の葉を用いて行われる。この理由としては、組織の摩砕が比較的容易であり、多糖類などの不純物の混合割合が比較的少なく、また、種子から短期間で育成可能である点が挙げられる。

【0081】

またオオムギのゲノムDNAを鋳型とし、上記プライマーの組み合わせを用いて増幅す



る方法は、従来公知のDNA増幅法を採用することができる。一般には、PCR法（ポリメラーゼ連鎖反応法）や、その改変法が用いられる。PCR法や、その改変法を用いる際の反応条件は特に限定されるものではなく、通常と同様の条件下で増幅することができる。

#### 【0082】

本発明にかかるDNAマーカーを用いることによって、赤カビ病抵抗性因子（2H-2因子、5H-1因子）を含むDNA断片を単離することが可能となり、上記DNA断片を用いることによって、オオムギの赤カビ病抵抗性に関与する遺伝子、および赤カビ病抵抗性のメカニズムの解明に利用が可能である。また上記DNA断片を植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）のゲノムDNAの導入することによって赤カビ病抵抗性植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）を生産（育種）することが可能となる。

#### 【0083】

また上記DNAマーカーは、赤カビ病抵抗性因子（2H-2因子、5H-1因子）に連鎖しているため、試験対象である植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）のゲノムDNA中における該DNAマーカーの多型を検出することによって、該植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）が赤カビ病抵抗性因子を有するか否かを判定することが可能となる。また同様に赤カビ病抵抗性因子（2H-2因子、5H-1因子）に連鎖しているため、試験対象である植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）のゲノムDNA中における該DNAマーカーの多型を検出することによって、該植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）が、赤カビ病抵抗性植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）であるか否かを判別することができる。また、上記DNAマーカーを増幅することができるプライマーまたは、上記DNAマーカーを固定したDNAマイクロアレイをキット化すれば、植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）の赤カビ病抵抗性因子の有無判定キット、および赤カビ病抵抗性植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）の判別キットを提供することが可能となる。

#### 【0084】

上述のごとく、本発明にかかるDNAマーカーは、様々な用途に利用が可能であることは明らかである。上述した本発明にかかるDNAマーカーの用途の一例については、後に詳細に説示する。

### 〔2. 本発明にかかるDNAマーカーの利用〕

#### ＜2-1. 本発明にかかる赤カビ病抵抗性因子を含むDNA断片の単離方法＞

上述のとおり本発明にかかるDNAマーカー（MM314、FM677）は、赤カビ病抵抗性因子のうち2H-2因子に連鎖するものである。一方本発明にかかるDNAマーカー（FM426、MM1057）は、赤カビ病抵抗性因子のうち5H-1因子に連鎖するものである。よって、MM314、FM677のDNAマーカーを用いることによって2H-2因子を含むDNA断片を単離することができ、FM426、MM1057のDNAマーカーを用いることによって5H-1因子を含むDNA断片を単離することができる。

#### 【0085】

本発明のDNAマーカーを用いて赤カビ病抵抗性因子を含むDNA断片を単離する方法としては特に限定されるものではないが、例えば次のような方法を挙げることができる。

#### 【0086】

オオムギではゲノムDNAのBACライブラリーが1種類作成されており、現在複数のBACライブラリーが開発中である。そこで、このようなBACライブラリーを用いて、従来公知のマッピングスクローニングの手法にしたがって、赤カビ病抵抗性因子と該因子に連鎖する本発明のDNAマーカーとで当該マーカーを含むBACクローンを同定し、そこからBACのコンティグを作成して塩基配列を確定することにより、最終的に赤カビ病耐性因子に到達することができる。

#### 【0087】

なお、上記方法をはじめとする赤カビ病抵抗性因子を含むDNA断片を単離するには、目的とする赤カビ病抵抗性因子に対してなるべく近傍に座乗するDNAマーカーを選択



して用いることが好ましい。目的とする赤カビ病抵抗性因子とDNAマーカーの間で組み換えが起こる確率がより低くなり、より確実に該赤カビ病抵抗性因子を単離することができるからである。例えば、2H-2因子をMM314（2H-2因子からの距離：約0cM）、FM677（2H-2因子からの距離：約0.6cM）を用いて単離する場合は、MM314の方がFM677より好適であるといえる。また5H-1因子をFM426（5H-1因子からの距離：約9cM）、MM1057（5H-1因子からの距離：約2.2cM）を用いて単離する場合は、MM1057の方がFM426より好適であるといえる。

#### 【0088】

<2-2. 本発明にかかる赤カビ病抵抗性植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）の生産方法、および該生産方法によって得られた赤カビ病抵抗性植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）>

上記本発明にかかる赤カビ病抵抗性因子を含むDNA断片の単離方法によって得られた赤カビ病抵抗性因子を含むDNA断片を植物のゲノムDNAに導入することによって、赤カビ病抵抗性植物を生産することが可能である。また特にオオムギのゲノムDNAに上記DNA断片を導入することによって、赤カビ病抵抗性オオムギを生産することが可能である。

#### 【0089】

より具体的には、公知の方法により、たとえばアグロバクテリウムまたはパーティクルガンを用いて植物やオオムギのゲノムDNAに導入することによって生産すればよく、これにより、赤カビ病抵抗性品種が得られることとなる。例えば、雑誌The Plant Journal (1997) 11(6), 1369-1376 には、Sonia Tingay等により、Agrobacterium tumefaciens を用いてオオムギを形質転換する方法が開示されており、この方法を利用して形質転換オオムギを生産可能である。

#### 【0090】

またオオムギ以外に赤カビ病抵抗性因子を含むDNA断片を導入する植物としては、特に限定されるものではないが、例えば、食用作物、果実や野菜、花・木その他の有効樹木を含む園芸作物、工芸作物、さらには飼肥料作物等が挙げられる。なお、上述した食用作物園芸作物、工芸作物、飼肥料作物にそれぞれ含まれる具体的な作物については、例えば、農学大辞典改訂第4版（養賢堂・1997年4月30日発行）の目次8～16頁にも詳細に記載されている。赤カビ病は、特にムギ類（オオムギ、コムギ、ライムギ、ライコムギ、エンバク等）の植物で問題となっており、このような植物について本発明を適用することはさらに有効である。

#### 【0091】

また、植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）に導入する赤カビ病抵抗性因子は、2H-2因子を含むDNA断片または5H-1因子を含むDNA断片のうちいずれか一方単独であっても赤カビ病抵抗性植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）を生産することは可能であるが、両者のDNA断片（2H-2因子を含むDNA断片、5H-1因子を含むDNA断片）が同一植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）のゲノムDNAに導入されることによれば、さらに赤カビ病に対する抵抗性をさらに向上させることができるためより好ましい。

#### 【0092】

また2H-2因子以外に2H染色体上に存在する赤カビ病抵抗性因子2H-1因子（条性遺伝子vrs1の遺伝子座と一致した赤カビ病抵抗性因子）を、上記2H-2因子を含むDNA断片または5H-1因子を含むDNA断片をそれぞれ単独導入した植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）に導入しても赤カビ病抵抗性が単独導入の場合に比して向上する。さらには、上記2H-1因子を、上記2H-2因子を含むDNA断片および5H-1因子を含むDNA断片とを両方を導入した植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）に導入しても赤カビ病抵抗性が2つの赤カビ病抵抗性因子を導入した場合に比べてさらに向上する。

## 【0093】

本発明者等は上記2H-2因子を含むDNA断片または5H-1因子を含むDNA断片のいずれかのDNA断片を単独で導入した場合のオオムギの赤カビ病抵抗性に対する効果と、両者のDNA断片を導入した場合のそれ、並びに上記3つの赤カビ病抵抗性因子を導入した場合のそれを解析ソフトウェア(MAPMAKER/QTLおよびQTL Cartographer)を用いて計算し比較している。以下表1にMAPMAKER/QTLを用いて解析した結果の一例を示す。

## 【0094】

【表1】

赤カビ病抵抗性を向上させる効果	
2H-2因子	1.8076
5H-1因子	1.1733
2H-2因子+5H-1因子	2.7338
2H-1因子(vrs1遺伝子)	1.3234
2H-2因子	1.5319
5H-1因子	1.6083
2H-1因子+2H-2因子+5H-1因子	3.6759

## 【0095】

表1は、2H-2因子を含むDNA断片または5H-1因子を含むDNA断片のいずれかのDNA断片を単独で導入した場合のオオムギの赤カビ病抵抗性を向上させる効果と、両者のDNA断片を導入した場合それを示している。さらに2H-1因子を含むDNA断片、または2H-2因子を含むDNA断片、または5H-1因子を含むDNA断片のいずれかのDNA断片を単独で導入した場合のオオムギの赤カビ病抵抗性を向上させる効果と、上記3つのDNA断片を全て導入した場合それを示している。

## 【0096】

表1の結果より、上記2H-2因子を含むDNA断片を単独で導入した場合のオオムギの赤カビ病抵抗性を向上させる効果は1.8076であり、5H-1因子を含むDNA断片のいずれかのDNA断片を単独で導入した場合のオオムギの赤カビ病抵抗性を向上させる効果は、1.1733であるのに対して、両者のDNA断片を導入した場合は、2.7338と明らかな累積効果が見られるということがわかる。さらに2H-1因子を加えて3つの赤カビ病抵抗性因子を含むDNA断片を導入することで顕著に赤カビ病抵抗性が向上することがわかる(2H-1因子を含むDNA断片単独導入の場合1.3234、2H-2因子を含むDNA断片単独導入の場合1.5319、5H-1因子を含むDNA断片単独導入の場合1.6083、上記3因子を含むDNA断片の導入の場合3.6759)。なお、表1中の「赤カビ病抵抗性を向上させる効果」の値が大きいほど当該効果が大きいということを示している。

## 【0097】

上記方法によって得られた本発明にかかる赤カビ病抵抗性オオムギをはじめとする赤カビ病抵抗性植物によれば、これまで赤カビ病によって品質・収穫量の低下、赤カビ病に感染した植物を食することによる人体・家畜への危害を効果的に回避することが可能となり、農業・畜産業等に極めて有効である。また食糧難の問題も改善することができる。

## 【0098】

なお上記「赤カビ病抵抗性植物」および「赤カビ病抵抗性オオムギ」とは、赤カビ病に対して全く抵抗性を有していなかった植物(例えばオオムギをはじめとするムギ類)に赤カビ病の抵抗性を付与することによって生産された植物(例えばオオムギをはじめとするムギ類)、および元来赤カビ病に抵抗性を有する植物(例えばオオムギをはじめとするムギ類)を指す。

ギ類)に赤カビ病抵抗性をさらに増強させることによって生産された植物(例えばオオムギをはじめとするムギ類)を含む意味である。

【0099】

<2-3.本発明にかかる赤カビ病抵抗性因子に連鎖するDNAマーカーの検出方法>  
上述のごとく本発明者等は赤カビ病抵抗性因子に連鎖するDNAマーカーを発見し、該DNAマーカーの増幅用のプライマーの設計を行なっている。

【0100】

具体的には、MM314は、  
AGAGATCCCTGCTCAGCTTG (配列番号1)に示される塩基配列を有するプライマー、  
およびTCGTATTAAAGGCCGCATAGG (配列番号2)に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第一プライマーセットを用いてオオムギゲノムDNAを鋳型として増幅されるDNAマーカーである。該DNAマーカーは2H-2因子に連鎖している。

【0101】

またFM677は、  
GCACGTAGCGTTCAACATCA (配列番号3)に示される塩基配列を有するプライマー、  
およびAACTTTTCCCAACCCCTTTCC (配列番号4)に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第二プライマーセットを用いてオオムギゲノムDNAを鋳型として増幅されるDNAマーカーである。該DNAマーカーは2H-2因子に連鎖している。

【0102】

またFM426は、  
CCGTGTGTCGTCTAGGTCAA (配列番号5)に示される塩基配列を有するプライマー、  
およびCAACTTTTGGTGGGACGTAGG (配列番号6)に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第三プライマーセット  
または  
CCGTGTGTCGTCTAGGTCAA (配列番号5)に示される塩基配列を有するプライマー、  
およびGGAAGAGTGATGGCGAAAC (配列番号7)に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第四プライマーセットを用いてオオムギゲノムDNAを鋳型として増幅されるDNAマーカーである。該DNAマーカーは5H-1因子に連鎖している。

【0103】

よって上記第一プライマーセットないし第四プライマーセットのいずれかを用いて増幅反応を行なうことによって、赤カビ病抵抗性因子(2H-2因子または5H-1因子)に連鎖するDNAマーカーを検出することができる。特に第一プライマーセットを用いることによって2H-2因子に連鎖するMM314を検出することができ、第二プライマーセットを用いることによって2H-2因子に連鎖するFM677を検出することができる。また第三プライマーセットまたは第四プライマーセットを用いることによって5H-1因子に連鎖するFM426を検出することができる。

【0104】

したがってプライマーセットは、上記4セットのうち少なくとも一組を用いることによって上記いずれかのDNAマーカーを検出することが可能であるが、第一プライマーセットおよび/または第二プライマーセットを用い、かつ第三プライマーセットおよび/または第四プライマーセットを用いることによって、2H-2因子および5H-1因子を両者検出することができるためより好ましい。

【0105】

上記赤カビ病抵抗性因子に連鎖するDNAマーカーの検出を行なうことによって、以下に示す赤カビ病抵抗性因子の有無の判定および赤カビ病抵抗性植物の判別を行なうことができる。なお上記赤カビ病抵抗性因子に連鎖するDNAマーカーの検出の具体的方法は、「本発明にかかる赤カビ病抵抗性因子の有無の判定方法」および「赤カビ病抵抗性植物の判別方法」においてあわせて説明する。

#### 【0106】

(2-3-1. 本発明にかかる赤カビ病抵抗性因子の有無の判定方法)

本発明にかかる赤カビ病抵抗性因子の有無の判定方法（以下適宜本判定方法と称する）は、上記本発明にかかる赤カビ病抵抗性因子に連鎖するDNAマーカー（MM314、FM677、FM426、MM1057）の検出方法において検出されたDNAマーカーのうち、少なくとも1つのDNAマーカーについて多型を検出することによって行なう。かかるDNAマーカーは赤カビ病抵抗性因子に連鎖するため、試験対象である植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）のゲノムDNA中に赤カビ病抵抗性型のDNAマーカーが存在すれば、試験対象植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）が赤カビ病抵抗性因子を有するか否かを高確率で判定することができる。ここで、MM314またはFM677の多型を検出することで2H-2因子の有無を判定することができ、FM426またはMM1057の多型を検出することで5H-1因子を検出することができるというものは言うまでもない。

#### 【0107】

なお本判定方法は、天然のオオムギについて行なってもよいし、薬剤等で変異処理をしたオオムギや交配によって育種されたオオムギ（植物）について行なってもよい。また上記2-2で説示した赤カビ病抵抗性因子（2H-2因子、5H-1因子）を含むDNA断片が導入されてなるオオムギおよび植物に適用することが可能である。よって本判別方法は、幅広く植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）に適用することができる。

#### 【0108】

ここで本判定方法の判定の精度（確率）については、以下のとおりである。赤カビ病抵抗性因子から2.2cMの距離に位置するDNAマーカーは、赤カビ病抵抗性因子とDNAマーカーとの間で染色分体あたり平均して1000分の22回組み換えが起こる。すなわち2.2%の確率で組み換えが起こる。よってこのDNAマーカーうち赤カビ病抵抗性型のものを検出すれば、97.8%の確率で赤カビ病抵抗性因子を有しているといえる。よって赤カビ病抵抗性因子とDNAマーカーとの距離が近いほど、高確率をもって赤カビ病抵抗性因子の有無を判定することができるといえる。

#### 【0109】

よって上記理由により、多型を検出するDNAマーカーは、上記DNAマーカーのいずれであっても赤カビ病抵抗性因子の有無を判定することが可能であるが、各赤カビ病抵抗性因子に対してなるべく近傍に座乗するDNAマーカーを検出することが好ましい。すなわち本判定方法において2H-2因子を検出する場合は、MM314（2H-2因子からの距離：約0cM）の方がFM677（2H-2因子からの距離：約0.6cM）より好適であるといえる。特にMM314は2H-2因子にほぼ一致するため、該DNAマーカーの多型を検出すればほぼ100%の確率をもって判定することができる。また5H-1因子を検出する場合は、MM1057（5H-1因子からの距離：約2.2cM）のほうがFM426（5H-1因子からの距離：約9cM）より好適であるといえる。

#### 【0110】

また本検出方法においては、複数のDNAマーカーの多型を検出してもよい。特に判定の精度（確率）を向上させるためには、赤カビ病抵抗性因子を挟む関係にあるDNAマーカーを選択して多型を検出すればよい。ここで2H-2因子を挟む関係にあるDNAマーカーの組み合わせとしては、MM314とFM677がある（図1(a)参照）。他方、5H-1因子を挟む関係にあるDNAマーカーの組み合わせとしては、FM426とMM1057がある（図1(b)参照）。

#### 【0111】

FM426とMM1057を例にして、該DNAマーカをそれぞれ単独で多型を検出した場合と、両方の多型を検出した場合とにおける本判定方法の精度（確率）についてより具体的に説明する。FM426は、5H-1因子から短腕側に約9cMの位置に座乗しており、該DNAマーカ-の多型を単独で検出したときの本判定方法の精度（確率）は、 $(1 - 90 \div 1000) \times 100 = \text{約} 91\%$ である。一方MM1057は、5H-1因子から長腕側に約2.2cMの位置に座乗しており、該DNAマーカ-の多型を単独で多型を検出したときの本判定方法の精度（確率）を同様に計算すると97.8%である。当該2つのDNAマーカ-の多型を両方検出すると、 $(1 - (90 \div 1000) \times (22 \div 1000)) \times 100 = 99.802\%$ となり高確率を持って5H-1の有無を判定することができる。よって、本判定方法において上記赤カビ病抵抗性因子を挟む関係にあるDNAマーカ-を検出して判定することは好ましい。

#### 【0112】

ここで本判定方法においてDNAマーカ-の検出には、従来公知のDNA増幅法を採用することができる。一般には、PCR法（ポリメラーゼ連鎖反応法）や、その改変法が用いられる。PCR法や、その改変法を用いる際の反応条件は特に限定されるものではなく、通常と同様の条件下で増幅することができる。上記増幅反応によって得られたDNAマーカ-が抵抗性型か罹病性型かを判断することにより試験対象植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）が赤カビ病抵抗性因子を有するか否かを判定することができるというものである。

#### 【0113】

本発明にかかるDNAマーカ-は前述のとおり以下のプライマーの組み合わせによって増幅することが可能である。

#### 【0114】

MM314は、  
AGAGATCCCTGCTCAGCTTG（配列番号1）に示される塩基配列を有するプライマー、  
およびTCGTATTAAAGGCCGCATAGG（配列番号2）に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第一プライマーセットを用いてゲノムDNAを鋳型として増幅することができる。

#### 【0115】

またFM677は、  
GCACGTAGCGTTCAACATCA（配列番号3）に示される塩基配列を有するプライマー、  
およびAACTTTTCCCAACCCTTTCC（配列番号4）に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第二プライマーセットを用いてゲノムDNAを鋳型として増幅することができる。

#### 【0116】

またFM426は、  
CCGTGTGTCGTCTAGGTCAA（配列番号5）に示される塩基配列を有するプライマー、  
およびCAACTTTTGGTGGGACGTAGG（配列番号6）に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第三プライマーセット、または  
CCGTGTGTCGTCTAGGTCAA（配列番号5）に示される塩基配列を有するプライマー、  
およびGGAAGAGTGATGGCGAAAAC（配列番号7）に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第四プライマーセットを用いてオオムギゲノムDNAを鋳型として増幅することができる。

#### 【0117】

以下表2に上記プライマーの組み合わせを用いた増幅反応によって増幅されてくるDNA断片長（増幅断片サイズ）を示す。

【0118】

【表2】

		増幅断片サイズ(bp)	
プライマーの組み合わせ		抵抗性型(Russia6等)	罹病性型(H.E.S.4等)
MM314	配列番号 1, 2	>524	>581
FM677	配列番号 3, 4	208	208
FM426	配列番号 5, 6	335	335
FM426	配列番号 5, 7	254	254

【0119】

上記プライマーの組み合わせによって増幅されてくるDNA断片には、赤カビ病抵抗性オオムギ品種のRussia6、Harbin2等を鋳型とした場合に増幅されてくる抵抗性型のもの(多型)と、赤カビ病罹病性オオムギ品種のH.E.S.4、Turkey6等を鋳型とした場合に増幅されてくる罹病性型のもの(多型)が存在する。本判定方法において抵抗性型のDNAマーカー(MM314、FM677、FM426、MM1057)が検出されてくれば、試験対象植物(例えばオオムギをはじめとするムギ類)が赤カビ病抵抗性因子を有すると判断することができる。一方罹病性型のDNAマーカー(MM314、FM677、FM426、MM1057)が検出されてくれば、試験対象植物(例えばオオムギをはじめとするムギ類)が赤カビ病抵抗性因子を有しないと判断することができる。

【0120】

ここでMM314の場合のように両者間で増幅断片サイズに差が有るものについては、アガロースゲル電気泳動等を用いてそのサイズを比較することで容易に増幅されてきたMM314が抵抗性型か罹病性型かを容易に判定することが可能である。つまり、>524bpの増幅断片が確認された場合は、抵抗性型のMM314が増幅されてきたことがわかり、試験対象の植物(例えばオオムギをはじめとするムギ類)が赤カビ病抵抗性因子を有すると判断することができる。一方、>581bpの増幅断片が確認された場合は、罹病性型のMM314が増幅されてきたことがわかり、試験対象の植物(例えばオオムギをはじめとするムギ類)が赤カビ病抵抗性因子を有しないと判断することが可能である。このことについては後述する実施例2においてさらに説明する。

【0121】

しかしFM677・FM426・MM1057については、表2から明らかなように増幅断片サイズに差が無い場合、アガロースゲル電気泳動等では増幅されたDNAマーカーが抵抗性型か罹病性型かを容易に判断することが困難である。この場合は増幅断片についてシーケンスを行ない、その塩基配列情報から抵抗性型か罹病性型かを確認することによって判断すればよい。あるいは、DNAマーカーの制限酵素サイト情報から増幅断片が抵抗性型か罹病性型かを判断してもよい。

【0122】

上記塩基配列情報および制限酵素サイト情報を用いて増幅断片が抵抗性型か罹病性型かを判断する方法について図2を用いて具体的に説明する。図2(a)には抵抗性型(Harbin2)のFM677の全塩基配列(配列番号8)を示し、図2(b)には罹病性型(Turkey6)のFM677の全塩基配列(配列番号9)を示している。また図2(c)には抵抗性型(Russia6)のFM426の全塩基配列(配列番号10)を示し、図2(d)には罹病性型(H.E.S.4)のFM426の全塩基配列(配列番号11)を示している。図2(a)および(b)中の下線部はセンスプライマー(配列番号3)部分を示しており、2重下線部はアンチセンスプライマー(配列番号4の相補配列)を示している。一方、図2(c)および(d)の下線部はセンスプライマー(配列番号5)部分を示しており、2重下線部はアンチセンスプライマー(配列番号6の相補配列)部分を示しており、波下線部は同じくアンチセンスプライマー(配列番号7の相補配列)である。図2(a)～(d)における

四角囲み文字で示した塩基は、抵抗性型と罹病性型間での塩基配列の異なる箇所を示している。よって増幅反応によって得られた増幅断片のシーケンスを行なえば、その増幅断片が抵抗性型のものか罹病性型のものかを判断できるということである。

#### 【0123】

また図2 (b) 中の破線部分は制限酵素A1uIの認識配列を示し、図2 (c) 中の破線部分は制限酵素HhaIの認識配列を示し、図2 (d) 中の破線部分は制限酵素AciIの認識配列を示している。また図2 (b) の矢印で示す箇所は制限酵素A1uIの切断箇所を示し、図2 (c) の矢印で示す箇所は制限酵素HhaIの切断箇所を示し、図2 (d) の矢印で示す箇所は制限酵素AciIの切断箇所を示している。よって、抵抗性型のFM677にはA1uIサイトは無く、罹病性型のFM677にはA1uIサイトが1つ存在するということがわかる。一方、抵抗性型のFM426にはHhaIサイトが1つ存在し、罹病性型のFM426にはAciIサイトが1つ存在するということがわかる。

#### 【0124】

これらの情報をもとにして、配列番号3および配列番号4に示す第二プライマーセットを用いた増幅反応、つまりFM677を検出するために行なった増幅反応で得られた増幅断片についてA1uIで消化した際に、切断されずに208bpの断片のみが検出されれば抵抗性型のFM677であると判断でき、1箇所切断され118bpと90bpの断片が検出されれば罹病性型のFM677であると判断することができる。

#### 【0125】

他方、配列番号5および配列番号6に示す第三プライマーセットを用いた増幅反応、つまりFM426を検出するために行なった増幅反応で得られた増幅断片(335bp)についてHhaIで消化した際に、一箇所切断され194bpと141bpの断片が検出されれば抵抗性型のFM426であると判断でき、切断されずに335bpの断片のみが検出されれば罹病性型のFM426であると判断することができる。

#### 【0126】

逆に同様の増幅反応で得られた増幅断片についてAciIで消化した際に切断されずに335bpの断片のみが検出されれば抵抗性型のFM426であると判断でき、一箇所切断され196bpと139bpの断片が検出されれば罹病性型のFM426であると判断することができる。

#### 【0127】

また配列番号5および配列番号7に示す第四プライマーセットを用いた増幅反応を用いてもFM426を検出することができる。この増幅反応で得られた増幅断片(254bp)についてHhaIで消化した際に、一箇所切断され194bpと60bpの断片が検出されれば抵抗性型のFM426であると判断でき、切断されずに254bpの断片のみが検出されれば罹病性型のFM426であると判断することができる。

#### 【0128】

逆に同様の増幅反応で得られた増幅断片についてAciIで消化した際に切断されずに254bpの断片のみが検出されれば抵抗性型のFM426であると判断でき、一箇所切断され196bpと58bpの断片が検出されれば罹病性型のFM426であると判断することができる。

#### 【0129】

上記事項については後述する実施例2においてより具体的に説明する。

#### 【0130】

また、DNAマーカーの多型を検出する方法として、AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) 分析を用いることも可能である。以下に本発明にかかるDNAマーカーMM1057についてAFLP分析を行なって、該DNAマーカーの多型を検出することについて説明する。

#### 【0131】

AFLP分析の手順は特に限定されるものではないが、例えば文献 (Pieter Vos, Rene Hogers, Marjo Bleeker, Martin Reijans, Theo van de Lee, Miranda Hornes, Adrie F



rijters, Jerina Pot, Johan Peleman, Martin Kuiper and Marc Zabeau. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research. 23:21:4407-4414. )の方法またはその改変法に従って行なえばよい。以下に発明者等がDNAマーカーMM 1057についてAFLP分析を行なった一例を示す。

#### 【0132】

50 ngのゲノムDNAを各1.5 UのEcoRI(タカラバイオ社製)およびMseI(NEW ENGLAND BioLabs社製)により、合計25  $\mu$ lの反応系において37℃で12時間ダブルダイジェストを行なった。制限酵素処理後のDNAに5  $\mu$ M EcoRIアダプター(塩基配列は配列番号14および配列番号15に示す)と50  $\mu$ M MseIアダプター(塩基配列は配列番号16および配列番号17に示す)を25 UのT4 ligase(タカラバイオ社製)によって37℃、3時間ライゲーションを行なった。上記ライゲーション後のDNA断片をEcoRIのユニバーサルプライマー(塩基配列は配列番号18に示す)とMseIのユニバーサルプライマー(塩基配列は配列番号19に示す)を用いてプレアンプリフィケーションを行なった。0.06 ng/ $\mu$ lプレアンプリフィケーションの反応溶液について、配列番号20に示される塩基配列を有するEcoRIのセレクトィブプライマー、および配列番号21に示される塩基配列を有するMseIのセレクトィブプライマーを用いて増幅反応を行なった。

#### 【0133】

上記増幅反応によって得られたDNA断片について電気泳動を行った結果を図7に示す。図7中で「R」を付したレーンが赤カビ病抵抗性オオムギ品種であるRussia6について上記AFLP分析を行なった結果を示す図であり、同図中「H」を付したレーンは、赤カビ病罹病性オオムギ品種のH.E.S. 4について上記AFLP分析を行なった結果を示す図である。その他のレーンについては、Russia6とH.E.S. 4の交配から育種した組み換え近交系統(RI系統)について上記AFLP分析を行った結果を示している。

#### 【0134】

図7のRussia6の結果とH.E.S. 4の結果を比較すると、赤カビ病抵抗性オオムギ品種のRussia6のみに約1057 bp(同図中の矢印で示す)のDNA断片が確認された。つまり赤カビ病抵抗性品種と赤カビ病罹病性品種とで多型があるということである。この多型を示すDNAマーカーをMM1057と称する。よってRI系統についてAFLP分析を行なって約1057 bpのサイズのDNA断片が確認されれば、そのRI系統は赤カビ病抵抗抵抗性因子を有すると判断することができ、逆に該DNA断片が確認されなければそのRI系統は赤カビ病抵抗性因子を有しないと判断することができる。なお、図7中でMを付したレーンはDNAサイズマーカーである。

#### 【0135】

(2-3-2. 本発明にかかる赤カビ病抵抗性植物(例えばオオムギをはじめとするムギ類)の判別方法)

上記本発明にかかる赤カビ病抵抗性因子の有無の判定方法(本判定方法)と同様にして、試験対象の植物(例えばオオムギをはじめとするムギ類)が赤カビ病抵抗性か否かを判断することができる。赤カビ病抵抗性因子を有する植物(例えばオオムギをはじめとするムギ類)は赤カビ病抵抗性を有することから、上記本判定方法を行なうことによって該植物(例えばオオムギをはじめとするムギ類)が、赤カビ病抵抗性植物(例えばオオムギをはじめとするムギ類)であるか否かを判別することができるといえる。換言すれば、本判定方法を用いて赤カビ病抵抗性因子の有無を判定することによって赤カビ病抵抗性植物(例えばオオムギをはじめとするムギ類)の判別方法(以下適宜本判別方法と称する)とすることができるということである。

#### 【0136】

本判別方法は、赤カビ病抵抗性植物(例えばオオムギをはじめとするムギ類)の育種の際の有効なスクリーニング手段として利用することができる。例えば、上記2-2において説示した本発明にかかる赤カビ病抵抗性植物(例えばオオムギをはじめとするムギ類)の生産方法を行なった際に、赤カビ病抵抗性因子を含むDNA断片が導入された形質転換



体植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）を多数の形質転換体候補から容易にスクリーニングすることができる。その他薬剤等の変異処理、交配などの育種処理を行なった植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）のスクリーニング手段としても利用可能である。

#### 【0137】

また本別方法は、本判定方法の項において説明したように2H-2因子、5H-1因子の有無をそれぞれ別個に判断することができるため、2H-2因子を含むDNA断片または5H-1因子を含むDNA断片がそれぞれ単独で導入されている植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）であるか、両者が導入されている植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）であるかまで区別して赤カビ病抵抗性植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）判別することができる。

#### 【0138】

なお本判別方法の精度（確率）は、上記本判定方法の項において説示したものと同様である。要するになるべく赤カビ病抵抗性因子（2H-2因子、5H-1因子）の近傍に位置するDNAマーカーを検出することによって、試験対象植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）が赤カビ病抵抗性植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）であるか否かをより高い精度（確率）をもって判別することができるということである。さらには、赤カビ病抵抗性因子を挟む関係にあるDNAマーカーを選択して検出すれば、さらに高い精度（確率）をもって試験対象植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）が赤カビ病抵抗性植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）であるか否かを判別することができるといえる。

#### 【0139】

<2-4. 本発明にかかるプライマー群>

本発明にかかるプライマー群は、

配列番号1に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号2に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第一プライマーセット、

配列番号3に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号4に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第二プライマーセット、

配列番号5に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号6に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第三プライマーセット、

配列番号5に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号7に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第四プライマーセットのうち、少なくとも1組からなる。

#### 【0140】

本発明にかかるプライマー群は、赤カビ病抵抗性因子（2H-2因子、5H-1因子）を増幅するためのプライマー群である。

#### 【0141】

上述のごとく、第一プライマーセットを用いることによって2H-2因子に連鎖するMM314を増幅することができ、第二プライマーセットを用いることによって2H-2因子に連鎖するFM677を増幅することができる。また第三プライマーセットまたは第四プライマーセットを用いることによって5H-1因子に連鎖するFM426を増幅することができる。

#### 【0142】

したがって本発明にかかるプライマー群は、上記4セットのうち少なくとも1組からなれば上記いずれかのDNAマーカーを増幅することが可能であるが、第一プライマーセットおよび第二プライマーセットのうち少なくとも1組と、第三プライマーセットおよび第四プライマーセットのうち少なくとも1組とからなれば、2H-2因子に連鎖するDNAマーカー（MM314、FM677）および5H-1因子連鎖するDNAマーカー（FM426）を両者増幅することができるためより好ましい。また本発明にかかるプライマー群が上記全てのプライマーセットからなれば、本発明にかかる全てのDNAマーカーが増

幅することができるために最も好ましい。

#### 【0143】

上記本発明にかかるプライマー群は、本発明にかかるDNAマーカーを増幅することができるため、上述の「2-3-1. 本発明にかかる赤カビ病抵抗性因子の有無の判定方法」および「2-3-2. 本発明にかかる赤カビ病抵抗性植物の判定方法」にDNA増幅するためのプライマーとして利用することが可能である。それゆえ本発明にかかるプライマー群を含むことによって、後述する赤カビ病抵抗性因子の有無判定キット、および赤カビ病抵抗性植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）の判別キットとすることができる。

#### 【0144】

<2-5. 本発明にかかる赤カビ病抵抗性因子の有無判定キット、および赤カビ病抵抗性植物の判別キット>

本発明にかかる赤カビ病抵抗性因子の有無判定キット（以下適宜本判定キットと称する）は、上述の「2-3-1. 本発明にかかる赤カビ病抵抗性因子の有無の判定方法」に用いられるキットであって、DNAマーカーを増幅するためのプライマーセットとして上記「2-4. 本発明にかかるプライマー群」含むことよりなる。

#### 【0145】

よって上述のごとく、第一プライマーセットがキットに含まれることによって2H-2因子に連鎖するMM314を検出することができ、第二プライマーセットが本判定キットに含まれることによって2H-2因子に連鎖するFM677を検出することができる。また第三プライマーセットまたは第四プライマーセットが本判定キットに含まれることによって5H-1因子に連鎖するFM426を検出することができる。

#### 【0146】

したがって本判定キットに含まれるプライマー群は、上記4セットのうち少なくとも1組からなれば上記いずれかのDNAマーカーを検出することが可能であるが、第一プライマーセットおよび第二プライマーセットのうち少なくとも1組と、第三プライマーセットおよび第四プライマーセットのうち少なくとも1組とからなれば、2H-2因子に連鎖するDNAマーカー（MM314、FM677）および5H-1因子連鎖するDNAマーカー（FM426）を両者検出することができるためより好ましい。また本発明にかかるプライマー群が上記全てのプライマーセットからなれば、本発明にかかる全てのDNAマーカーが検出することができるために最も好ましい。

#### 【0147】

この他本判定キットには、PCRを行なうための酵素、試薬類が含まれていてもよいし、鋳型となるゲノムDNAの調製するために必要な試薬、バッファー類、遠心チューブが含まれていてもよいし、目的のDNAサイズバンドの検出に必要となるDNAマーカー（MM314、FM677、FM426）または、適当なDNAサイズマーカーが含まれていてもよい。

#### 【0148】

なお、本判定キットと同じ構成によって赤カビ病抵抗性植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）の判別キットとすることができる。このことについては、上述したとおり本判定キットを用いて赤カビ病抵抗性因子の有無を判定することにより、試験対象植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）が赤カビ病抵抗性因子を持っているか否かを判定できる、つまり赤カビ病抵抗性植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）であるかどうか判別できるということに起因する。

#### 【0149】

<2-6. 本発明にかかるDNAマイクロアレイ>

本発明にかかるDNAマイクロアレイ（以下適宜、本DNAマイクロアレイと称する）は、本発明にかかるDNAマーカー（MM314、FM677、FM426、MM1057）を適当な基板（ガラス、シリコンウエハ、ナイロンメンブレン等）上に固定されてなる。本DNAマイクロアレイに対して、試験対象の植物から調製したプローブを反応させ

、その時に発するシグナルを検出することで、複数のDNAマーカーを容易かつ同時に検出することが可能である。したがって本DNAマイクロアレイは、本発明にかかるDNAマーカーの多型を検出する手段として用いることができる。よって、赤カビ病抵抗性因子の有無の判定方法、赤カビ病抵抗性植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）の判別方法における検出手段として利用可能である。また、本DNAマイクロアレイを赤カビ病抵抗性因子の有無判定キット、または赤カビ病抵抗性植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）の判別キットに加えることもできる。なお上記該キットにはDNAマイクロアレイからのシグナルを検出するために用いる試薬・器具・装置等が含まれていてもよい。

#### 【0150】

本DNAマイクロアレイの基板には、本発明にかかるマーカー（MM314、FM677、FM426、MM1057）のうち少なくとも1つ以上のDNAマーカーが固定されていればよい。また抵抗性型のDNAマーカー、罹病性型のDNAマーカーのいずれか一方もしくは両方が固定されてもよい。さらにより高精度（確率）をもって赤カビ病抵抗性因子の有無を判断するためには、各赤カビ病抵抗性因子（2H-2因子、5H-1因子）を挟む関係にある複数のDNAマーカーの組み合わせが固定されていることが好ましい。より具体的には、2H-2因子を挟む関係にあるDNAマーカーの組み合わせとしては、MM314とFM677の組み合わせがあり、5H-1因子を挟む関係にあるDNAマーカーの組み合わせとしては、FM426とMM1057の組み合わせがある。

#### 【0151】

また上記組み合わせのうち少なくとも1つ以上の組み合わせが基板上に固定されていれば、2H-2因子または5H-1因子の有無を判定することが可能であるが、2H-2因子および5H-1因子ともに検出することができるという意味では、MM314とFM677の組み合わせが基板上に固定され、かつFM426とMM1057の組み合わせが含まれていることが最も好ましい。

#### 【0152】

上記複数のDNAマーカーが固定された本DNAマイクロアレイを用いることによって、一度の試行で複数のDNAマーカーを簡便に検出することができる。さらに赤カビ病抵抗性因子の有無の判断を高い精度（確率）をもって行なうことができる。

#### 【0153】

なお、本DNAマイクロアレイには、本発明にかかるDNAマーカーのみならずその近傍に位置するその他のDNAマーカーが固定されていてもよい。

#### 【0154】

さらに本DNAマイクロアレイには、本発明にかかるDNAマーカーがオオムギの染色体上に並んでいる順序で固定されているか、あるいはオオムギの染色体上に並んでいる順序に対応する配列位置情報が付与されて固定されていることが好ましい。試験対象がオオムギである際に検出の精度をさらに向上させることが可能となるからである。つまり、従来のアレイを用いた解析において、あるスポットに対するシグナルが得られなかった場合、本当に検出しようとするDNAマーカーが存在しないのか、または解析の実験上のミスによりシグナルが得られていないのかについては、改めて確認しなければ正確には判定することはできなかった。これに対して、上記本DNAマイクロアレイを用いる場合においては、固定化されているDNAマーカーの染色体上の順序が確認できるように配列されているため、上記のような実験上でのミスか否かを容易に判定することが可能となる。

#### 【0155】

具体的には、例えば、シグナルが得られなかったスポットの前後のスポットでシグナルが得られたとする。本発明にかかるアレイでは、各スポットは、染色体上に並んでいる順序が確認できるように配列されている。通常、染色体上に直線上に近接して並んでいる遺伝子のうち一つの遺伝子のみが組み換わるためには2つの組み換えがごく近傍で起こらなくてはならない。このような現象が起る確率が極めて低いため、シグナルが得られなかったという結果は、実験上のミスによるものであると判断される。このように、本DNAマイクロアレイでは、あるスポットに対するシグナルが得られなかった場合でも、実験上

でのミスか否かを容易に判定することが可能となるため、解析の精度を向上することができる。

# 【0156】

なお本発明は上述した各実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。

## 【実施例】

# 【0157】

〔実施例1：オオムギの赤カビ病抵抗性に関するQTL解析〕

オオムギの赤カビ病抵抗性因子を検索するためにQTL解析を行なった。

# 【0158】

＜材料＞赤カビ病に対する抵抗性が大きく異なるオオムギ品種Russia6（二条、抵抗性）とH.E.S.4（六条、罹病性）の交配から育種した組み換え近交系統（RI系統）を用いて行なった。

# 【0159】

＜赤カビ病抵抗性の評価方法＞

「切り穂検定法」（非特許文献4参照）の改変法で評価した。簡単には以下のとおりに行なった。

# 【0160】

材料を慣行法で栽培し、それぞれの系統の開花期に止葉をつけて上から2番目の節間で穂を切り取ったものを水道水をかけ流しにしたステンレス製のバットに立てた。これに対して、赤カビ病菌の分生子が顕微鏡200倍視野当たり15個程度になるように調整した懸濁液を十分に噴霧した。分生子接種後2日間は25℃・湿度100%の条件下、その後の6日間は18℃・湿度90%前後の人工気象室にて栽培した。光条件は日長14時間・照度約10,000luxとした。分生子接種後8日目に肉眼で観察して黄褐色に変色した穎花を罹病粒として罹病性小穂歩合を調査し、表3に示す基準に従って0（抵抗性）～10（罹病性）のスコアで評価している。

# 【0161】

## 【表3】

スコア	0	2	4	6	8	10
罹病性小穂歩合(%)	0	1～5	6～20	21～40	41～60	61～100

# 【0162】

またQTL解析のアルゴリズムには、simple interval mapping（SIM）とcomposite interval mapping（CIM）を用い、解析ソフトウェアにはそれぞれ、MAPMAKER/QTLとQTL Cartographerを用いて行なった。

# 【0163】

上記QTL解析の結果、特にCIMの結果を図3に示す。QTL解析は同じ集団について2回行っており、それぞれの結果を示している（1回目の結果を実線で、2回目の結果を破線で示す）。図3（a）は2H染色体についてのQTL解析の結果を示し、図3（b）は5H染色体についてQTL解析を行なった結果を示している。また横軸は染色体上の座を示し、左側が短腕側（5'端側）で右側が長腕側（3'端側）を示している。一方縦軸はLODスコア（対数尤度）を示している。このLODスコアは、赤カビ病抵抗性の形質を支配する遺伝子（赤カビ病抵抗性因子）とその座に存在するDNAマーカーの連鎖の尺度であり、一般にLODスコアが2または3を超えた場合に、そのDNAマーカーとQTLと連鎖関係にあることが推定される。つまりその遺伝子座に赤カビ病抵抗性因子が存在すると推定することができるということである。

# 【0164】

図3（a）の結果より、オオムギの2H染色体上に2つ赤カビ病抵抗性に関するQTL

が検出され、図3 (b) の結果より5H染色体上に1つの赤カビ病抵抗性に関するQTLが検出された。オオムギの2H染色体で検出されたQTLのうち1つは、公知の条性遺伝子(vrs1)の位置(図3 (a) 矢印で示す)と一致したことより、vrs1遺伝子の多発現の可能性が示唆された。この結果は、これまでの赤カビ病抵抗性に対する条性の関与を支持する結果であった。しかしその他のQTLの遺伝子座に存在する遺伝子については未知であり、条性遺伝子以外の赤カビ病抵抗性因子が存在しているものと考えられた。ここで特にオオムギの2H染色体上に存在しvrs1遺伝子の位置とは異なる遺伝子座に存在する赤カビ病抵抗性因子を「2H-2因子」と命名し、オオムギの5H染色体上に座乗するそれを「5H-1因子」と命名した。

#### 【0165】

発明者等が作成した高密度連鎖地図の情報をもとに、上記赤カビ病抵抗性因子2H-2因子、5H-1因子の遺伝子座の近傍に位置するDNAマーカーを検索し、特に上記赤カビ抵抗因子に強連鎖するDNAマーカー、すなわち本発明にかかるDNAマーカーを発見するに至った。2H-2因子に連鎖するDNAマーカーとしてMM314およびFM677を発見した。また5H-1因子に連鎖するDNAマーカーとしてFM426、MM1057を発見した。

#### 【0166】

これらのDNAマーカーはいずれもAFLPマーカーであるため、それぞれをSTS化し、そのシーケンス情報から各DNAマーカーの増幅用プライマーを設計した。MM314は配列番号1および配列番号2に示す第一プライマーセットを用いて増幅することができ、FM677は配列番号3および配列番号4に示す第二プライマーセットを用いて増幅することができる。一方FM426は配列番号5および配列番号6に示す第三プライマーセット、または配列番号5および配列番号7に示す第四プライマーセットを用いて増幅することができる。

#### 【0167】

【実施例2：DNAマーカーの検出による赤カビ病抵抗性因子の有無の判断（赤カビ病抵抗性オオムギの判別）】

本発明にかかるDNAマーカーを検出することによって、試験対象オオムギが赤カビ病抵抗性因子を有するか否かを判断した。またその結果から赤カビ病抵抗性オオムギの判別を行なった。

#### 【0168】

<試験対象オオムギ>

赤カビ病に対する抵抗性が大きく異なるオオムギ品種Russia6（二条、抵抗性）とH.E.S.4（六条、罹病性）の交配から育種した組み換え近交系統（以下RI系統と称する）を用いた。

#### 【0169】

<DNAの抽出>

温室で育成した前記RI系統の葉身からLanbrigeらの方法（Peter Langrige, Angelo K arakousis and Jan Nield. (1997) Practical Workshop in Basic Recombinant DNA Techniques Course Manual. Waite Agricultural Research Institute University of Adelaide. 参照）によってDNAを抽出した。DNA濃度は分光光度計および1%アガロースゲル電気泳動によって測定し、RNaseと1×TEを加えて1μg/μlに調整した。

#### 【0170】

<PCR>

PCR反応液の組成は5U/μl TaKaRa Ex Taq™（タカラバイオ社製）0.05μl, 10×PCR Buffer 1μl, 2.5mM dNTPs 0.8μl, 10μM Primer（センスプライマー、アンチセンスプライマー）各0.25μl, 鋳型DNA 1μlを混合し、蒸留水にて全量10.0μlとした。

#### 【0171】

増幅反応は、図4に示す条件にて行なった。

## 【0172】

<HhaI消化>

PCR産物10 $\mu$ l、10 $\times$ M buffer (タカラバイオ社製) 1 $\mu$ l、HhaI (タカラバイオ社製) 0.2 $\mu$ lを混合し、蒸留水にて全量10 $\mu$ lとした。

## 【0173】

反応は、37 $^{\circ}$ Cで一晩行なった。

## 【0174】

<DNAバンドの検出>

PCR産物に等量のホルムアミドダイを加え95 $^{\circ}$ C・5分間加熱後、氷中で急冷した。このサンプルを7%ポリアクリルアミドゲル (アクリルアミド:ビスアクリルアミド=19:1、尿素:8.5M、0.5 $\times$ TBE) で電気泳動 (280V、3時間) を行なった。DNAの染色は、TMVistra Green nucleic acid gel stain (Amersham pharmacia biotech co.) により行なった。また、DNAバンドの検出には、LAS-1000plus (富士フイルム社製) を用いる方法か、あるいはsil-Best Stain for Protein/PAGE (ナカライテスク社製) を用いた銀染色法 (菅野 康吉、1997、「増幅断片の検出と標識5 銀染色、PCR法最前線 基礎技術から応用まで」、関谷 剛男・藤永 編、共立出版、p85~87参照) により行なった。

## 【0175】

なお、必要に応じてPCR産物を適当な制限酵素で消化したものを上記方法によりDNAバンドを検出した。

## 【0176】

<結果>

配列番号1および2に記載のプライマーを用いて、Russia6、H.E.S.4、およびRI系統からのゲノムDNAを鋳型としてPCRを行ない、得られたPCR産物について電気泳動を行なった結果を図5(a)に示した。

## 【0177】

図5(a)は配列番号1および配列番号2に示される塩基配列を有するプライマーを用いてPCRを行なった結果であることより、本発明にかかるDNAマーカーMM314の多型を検出したものである。図5(a)の左のレーンから順にRussia6、H.E.S.4、および各RI系統の結果を示している。よって抵抗性のRussia6のレーンに見られる>524bpの断片が抵抗性型のMM314である。よってRI系統においてかかる>524bpの断片が検出されれば、そのRI系統は2H-2因子を持つ可能性が高いということが判断でき、さらにはそのRI系統は赤カビ病抵抗性オオムギである可能性が高いということが判断できる。すなわち、図5(a)中のRI系統のうちa1・a2・a4およびa5は、2H-2因子を持つ可能性が高いということが判断でき、さらにはそのRI系統は赤カビ病抵抗性オオムギである可能性が高いということが判断できた。

## 【0178】

一方、罹病性のH.E.S.4のレーンで見られる>581bpの断片を持つRI系統は、2H-2因子を持っていない可能性が高く、赤カビ病罹病性オオムギである可能性が高いと判断できる。すなわち、図5(a)中のRI系統のうちa3は、2H-2因子を持っていない可能性が高く、赤カビ病罹病性オオムギである可能性が高いと判断できた。

## 【0179】

次に配列番号5および配列番号7に示される塩基配列を有するプライマーを用いて、Russia6、H.E.S.4、およびRI系統からのゲノムDNAを鋳型としてPCRを行ない得られたPCR産物をHhaI消化したものについて電気泳動を行なった結果を図5(b)に示した。

## 【0180】

配列番号5および配列番号7に示される塩基配列を有するプライマーを用いてPCRを行なっていることより、本発明にかかるDNAマーカーFM426の多型を検出したものである。ただしFM426は、表2に示したように得られる増幅断片のサイズが同一であ

るため、増幅産物そのものを電気泳動にかけても該DNAマーカーの多型を検出することができない。そこで図2(c)、(d)に示したように、赤カビ病抵抗性オオムギRussia 6の増幅産物を切断するが赤カビ病に対する罹病性オオムギH.E.S. 4の増幅産物を切断しない制限酵素、つまりHhaIにて消化を行ない、その切断断片のサイズを確認することによって、本発明にかかるDNAマーカーであるか否かを判断することとした。

#### 【0181】

より具体的には、この増幅反応で得られた増幅断片(254bp)についてHhaIで消化した際に、一箇所切断され194bpと60bpの断片が検出されれば抵抗性型のDNAマーカー(FM426)であると判断でき、切断されずに254bpの断片のみが検出されれば罹病性型のDNAマーカー(FM426)であると判断することができる。

#### 【0182】

図5(b)には、上記各増幅断片のHhaI消化物の電気泳動結果を示しており、左のレーンから順にRussia6、H.E.S. 4、および各RI系統の結果を示している。図5(b)の結果によれば、抵抗性オオムギ品種であるRussia6のレーンには、確かに194bpと60bpの断片が見られ、罹病性オオムギ品種であるH.E.S. 4のレーンでは254bpの断片のみが見られるということがわかる。よって各RI系統においてかかる194bpと60bpの断片が検出されれば、そのRI系統は5H-1因子を持つ可能性が高いということが判断でき、さらにはそのRI系統は赤カビ病抵抗性オオムギである可能性が高いということが判断できる。すなわち、図5(b)中のRI系統のうちb3およびb4は、5H-1因子を持つ可能性が高いということが判断でき、さらにはそのRI系統は赤カビ病抵抗性オオムギである可能性が高いということが判断できる。

#### 【0183】

一方、254bpの断片を持つRI系統は、5H-1因子を持っていない可能性が高く、赤カビ病罹病性オオムギである可能性が高いと判断できる。すなわち、図5(b)中の各RI系統のうちb1・b2およびb5は、5H-1因子を持っていない可能性が高く、赤カビ病罹病性オオムギである可能性が高いと判断できる。

#### 【0184】

〔実施例3：本発明にかかる赤カビ病抵抗性オオムギの判別結果と赤カビ病抵抗性スコアとの関係〕

DNAマーカーを指標として赤カビ病抵抗性オオムギか否かを判断した結果と、赤カビ病抵抗性スコアの関係を検討した。

#### 【0185】

##### <試験対象オオムギ>

赤カビ病に対する抵抗性が大きく異なるオオムギ品種Russia6(二条、抵抗性)とH.E.S. 4(六条、罹病性)の交配から育種した組み換え近交系統(RI系統)を用いた(n=121)。

#### 【0186】

##### <赤カビ病抵抗性スコア>

赤カビ病抵抗性スコア(Scab score)は、「切り穂検定法」(非特許文献4参照)の改変法で評価した。簡単には以下のとおりに行なった。

#### 【0187】

試験対象オオムギ(RI系統)をそれぞれ慣行法で栽培し、それぞれの系統の開花期に止葉をつけて上から2番目の節間で穂を切り取ったものを水道水をかけ流しにしたステンレス製のバットに立てた。これに対して、赤カビ病菌の分生子が顕微鏡200倍視野当たり15個程度になるように調整した懸濁液を十分に噴霧した。分生子接種後2日間は25℃・湿度100%の条件下、その後の6日間は18℃・湿度90%前後の人工気象室にて栽培した。光条件は日長14時間、照度約10,000luxとした。分生子接種後8日目に肉眼で観察して黄褐色に変色した穎花を罹病粒として罹病性小穂歩合を調査し、表3に示す基準に従って0(抵抗性)~10(罹病性)のスコアで評価した(表3参照)。

#### 【0188】



### < DNA マーカーの検出 >

DNA マーカーを上記実施例 2 に示した方法と同様にして DNA マーカーが抵抗性型か、罹病性型かを判断することによって行なった。判断対象とする赤カビ病抵抗性因子は、2H-2 因子、5H-1 因子および Vrs1 遺伝子について行なった。

【0189】

### < 結果 >

図 6 に結果を示す。図 6 の横軸は赤カビ病抵抗性スコアを示し、縦軸は個体数を示している。また矢印赤カビ病抵抗性の Russia6、および赤カビ病に罹病性の H.E.S. 4 の赤カビ病抵抗性スコアを示している。また図中黒塗りのシンボルは 3 つ全ての DNA マーカーが赤カビ病抵抗性型を示した R I 系統についての赤カビ病抵抗性スコアの結果を示し、斜線のシンボルは 3 つ全ての DNA マーカーが罹病性型を示した R I 系統についての赤カビ病抵抗性スコアを示し、白抜きのシンボルは、DNA マーカーが抵抗性型、罹病性型の両方混在していた R I 系統についての赤カビ病抵抗性スコアを示している。

【0190】

図 6 の結果によると、3 つ全ての DNA マーカーが赤カビ病抵抗性型を示した R I 系統は赤カビ病抵抗性スコア値が低い、つまり赤カビ病抵抗性品種である確率が高く、逆に 3 つ全ての DNA マーカーが罹病性型を示した R I 系統は赤カビ病抵抗性スコアが高い、つまり赤カビ病に対して罹病性品種である確率が高いということがわかった。

【0191】

よって、本発明にかかる DNA マーカーを指標として、赤カビ病抵抗性オオムギか否かを判断する方法は極めて有効であるということがわかった。

### 【産業上の利用可能性】

【0192】

本発明によれば、オオムギの赤カビ病抵抗性のメカニズムの解明・赤カビ病抵抗性植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）の生産・赤カビ病抵抗性因子の有無の判断・赤カビ病抵抗性植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）の判別等を行なうことが可能となる。よって、これまで赤カビが原因で収穫量の低下・品質の低下・人体被害等を被っていたオオムギをはじめとする植物に対して適用すればその病害を減少させることができる。従って、園芸農業をはじめとする農業全般に利用可能である。さらには、オオムギ等を原料とする食品産業においても有効である。

### 【図面の簡単な説明】

【0193】

【図 1】図 1 (a) は 2H 染色体上の DNA マーカー (MM314, FM677) および 2H-2 因子の位置関係を示す図であり、図 1 (b) は 5H 染色体上の DNA マーカー (FM426, MM1057) および 5H-1 因子の位置関係を示す図である。

【図 2】図 2 (a) は抵抗性型 (Harbin2) の FM677 の全塩基配列 (配列番号 8) を示す図であり、図 2 (b) には罹病性型 (Turkey6) の FM677 の全塩基配列 (配列番号 9) を示す図であり、図 2 (c) は抵抗性型 (Russia6) の FM426 の全塩基配列 (配列番号 10) を示す図であり、図 2 (d) は罹病性型 (H.E.S. 4) の FM426 の全塩基配列 (配列番号 11) を示す図である。

【図 3】オオムギの赤カビ病抵抗性に関する QTL 解析 (CIM) を行なった結果を示すグラフである。

【図 4】実施例 2 における PCR の反応条件を示す図である。

【図 5】図 5 (a) は配列番号 1 および 2 に記載のプライマーを用いて、Russia6、H.E.S. 4、および R I 系統からのゲノム DNA を鋳型として PCR を行なった際に得られた PCR 産物について電気泳動を行なった結果を示す図であり、図 5 (b) は配列番号 5 および 7 に記載のプライマーを用いて、Russia6、H.E.S. 4、および R I 系統からのゲノム DNA を鋳型として PCR を行なった際に得られた PCR 産物を、さらに HhaI 消化したものについて電気泳動を行なった結果を示す図である。



【図 6】 DNA マーカーを指標として赤カビ病抵抗性オオムギか否かを判断した結果と、赤カビ病抵抗性スコアの関係を示すヒストグラムである。

【図 7】 Russia 6、H.E.S. 4、および R I 系統について AFL P 分析を行なった際の各電気泳動図である。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Agency

<120> DNA markers that linked to genes associated with  
Fusarium head blight, and use thereof

<130> A181P84

<160> 21

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotides

<400> 1

agagatccct gctcagcttg

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotides

<400> 2

tcgtattaag gccgcatagg

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotides

<400> 3

gcacgtagcg ttcaacatca

20

<210> 4  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Oligonucleotides

<400> 4  
aacttttccc aaccctttcc 20

<210> 5  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Oligonucleotides

<400> 5  
ccgtgtgtcg tctaggtcaa 20

<210> 6  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Oligonucleotides

<400> 6  
caacttttgtt gggacgtagg 20

<210> 7  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Oligonucleotides

<400> 7  
gttttcgcca tcactcttcc 20

<210> 8  
<211> 208

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Hordeum vulgare ssp.

&lt;400&gt; 8

```
gcacgtagcg ttcaacatca catctcatct ttggcaaaag aaatgggtcaa tcggcacact 60
ctcagttttt tgcacaaaaa tgtcccatga gaccaccaac atgtgcttcc cgcaatagta 120
gtaaacgaac aaagcaatct agaatgcata gtttgtagc acgaaacagg aaaccatcat 180
gcacataaaa cttttcccaa ccctttcc                                     208
```

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 208

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Hordeum vulgare ssp.

&lt;400&gt; 9

```
gcacgtagcg ttcaacatca catctcatct ttggcaaaag aaatgggtcaa tcggcacact 60
ctcagttttt tgcacaaaaa tgtcccatga gaccaccaac atgtgcttcc cgcaatagta 120
gtaaacgaac aaagctatct agaatgcata gtttgtagc acgaaacagg aaaccatcat 180
gcacataaaa cttttcccaa ccctttcc                                     208
```

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 335

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Hordeum vulgare ssp.

&lt;400&gt; 10

```
ccgtgtgtcg tctaggtcaa ccatgacaac aactacgtgt ggtcgtgact ttggcctgct 60
gttgtcacct caccatggat tgttgtctcc atcaaaagtt atttgtgaga gtttcatctc 120
tgcagatctg gtggttgact ttggtggcat gatcataact atggacggag tcttgatccg 180
gagggatggg tgtgcgcaa cgaaggtcac attgcatgta attgttcnga tcacggaaga 240
gtgatggcga aaacacatga gtgacttcaa tgggtggtgtt acttcagtat ccggtatcaa 300
gcttcanggc aaaagcctac gtcccaccaa agttg                                     335
```

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 335

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Hordeum vulgare ssp.

&lt;400&gt; 11

```
ccgtgtgtcg tctaggtcaa ccatgacaac aactacgtgt ggtcgtgact ttggcctgct 60
gttgtcacct caccatggat tgttgtctcc atcaaaagtt atttgtgaga gtttcatctc 120
tgcagatctg gtggttgact ttggtggcat gatcataact atggacggag tcttgatccg 180
gagggatggg tgtgcggcaa cgaaggtcac attgcatgta attgttcnga tcacggaaga 240
gtgatggcga aaacacatga gtgacttcaa tgggtggtgtt acttcagtat ccggtatcaa 300
gcttcanggc aaaagcctac gtcccaccaa agttg                                     335
```

<210> 12  
<211> 254  
<212> DNA  
<213> *Hordeum vulgare* ssp.

<400> 12  
ccgtgtgtcg tctagggtcaa ccatgacaac aactacgtgt ggtcgtgact ttggcctgct 60  
gttgtcacct caccatggat tgtgggtctcc atcaaaagtt atttgtgaga gtttcatctc 120  
tgcagatctg gtggttgact ttggtggcat gatcataact atggacggag tcttgatccg 180  
gagggatggg tgtgcgcaa cgaaggtcac attgcatgta attgttcnga tcacggaaga 240  
gtgatggcga aaac 254

<210> 13  
<211> 254  
<212> DNA  
<213> *Hordeum vulgare* ssp.

<400> 13  
ccgtgtgtcg tctagggtcaa ccatgacaac aactacgtgt ggtcgtgact ttggcctgct 60  
gttgtcacct caccatggat tgtgggtctcc atcaaaagtt atttgtgaga gtttcatctc 120  
tgcagatctg gtggttgact ttggtggcat gatcataact atggacggag tcttgatccg 180  
gagggatggg tgtgcgcaa cgaaggtcac attgcatgta attgttcnga tcacggaaga 240  
gtgatggcga aaac 254

<210> 14  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Oligonucleotides

<400> 14

ctcgtagact gcgtacc 17

<210> 15  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Oligonucleotides

<400> 15  
aattggtacg cagtctac

18

<210> 16  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Oligonucleotides

<400> 16  
gacgatgagt cctgag 16

<210> 17  
<211> 14  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Oligonucleotides

<400> 17  
tactcaggac tcat 14

<210> 18  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Oligonucleotides

<400> 18  
gactgcgtac caattc 16

<210> 19  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Oligonucleotides

<400> 19  
gatgagtcct gagtaa 16

<210> 20

<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Oligonucleotides

<400> 20  
gactgcgtac caattcccg

19

<210> 21  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

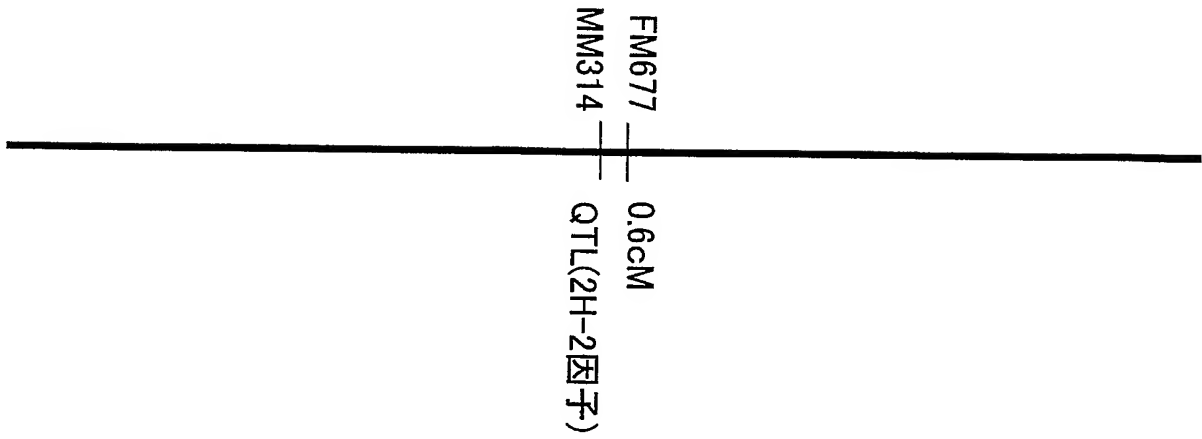
<220>  
<223> Oligonucleotides

<400> 21  
gatgagtcct gagtaaacg

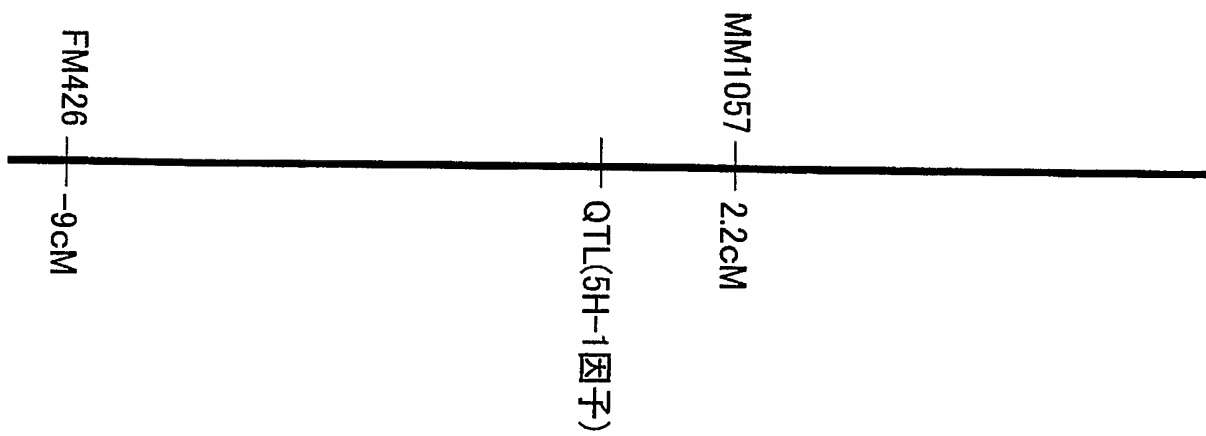
19

【書類名】 図面  
【図 1】

(a)



(b)





## 【図 2】

( a )

GCACGTAGCGTTCAACATCACATCTCATCTTTGGCAAAGAAATGGTCAATCGGCACACT  
CTCAGTTTTTTGCACCAAATGTCCCATGAGACCACCAACATGTGCTTCCCGCAATAGTA  
GTAAACGAACAAAGC<sup>↓</sup>ATCTAGAATGCATAGTTTGTTAGCACGAAACAGGAAACCATCAT  
GCACATAAACTTTTCCCAACCCTTTCC

( b )

GCACGTAGCGTTCAACATCACATCTCATCTTTGGCAAAGAAATGGTCAATCGGCACACT  
CTCAGTTTTTTGCACCAAATGTCCCATGAGACCACCAACATGTGCTTCCCGCAATAGTA  
GTAAACGAACAAAGC<sup>↓</sup>ATCTAGAATGCATAGTTTGTTAGCACGAAACAGGAAACCATCAT  
GCACATAAACTTTTCCCAACCCTTTCC

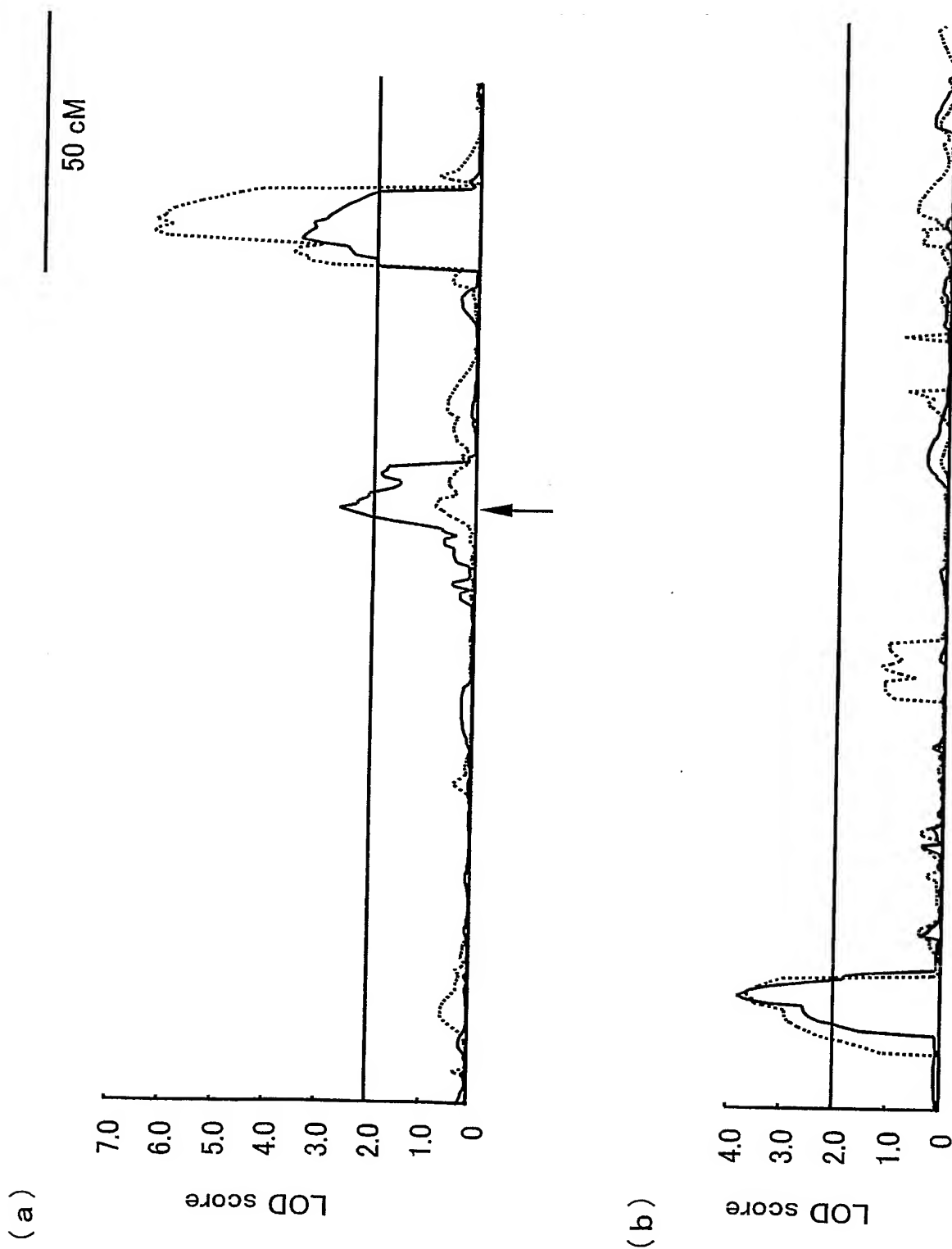
( c )

CCGTGTGTCGTCTAGGTCAACCATGACAACAACACTACGTGTGGTCGTGACTTTGGCCTGCT  
GTTGTCACCTCACCATGGATTGTGGTCTCCATCAAAAGTTATTTGTGAGAGTTTCATCTC  
TGCAGATCTGGTGGTTGACTTTGGTGGCATGATCATAACTATGGACGGAGTCTTGATCCG  
GAGGGATGGTTGTGCG<sup>↓</sup>CAACGAAGGTCACATTGCATGTAATTGTTTCNGATCACGGAAGA  
GTGATGGCGAAAACACATGAGTGACTTCAATGGTGGTGTTACTTCAGTATCCGGTATCAA  
GCTTCANGGCAAAGCCTACGTCCCACCAAAGTTG

( d )

CCGTGTGTCGTCTAGGTCAACCATGACAACAACACTACGTGTGGTCGTGACTTTGGCCTGCT  
GTTGTCACCTCACCATGGATTGTGGTCTCCATCAAAAGTTATTTGTGAGAGTTTCATCTC  
TGCAGATCTGGTGGTTGACTTTGGTGGCATGATCATAACTATGGACGGAGTCTTGATCCG  
GAGGGATGGTTGTGCG<sup>↓</sup>CAACGAAGGTCACATTGCATGTAATTGTTTCNGATCACGGAAGA  
GTGATGGCGAAAACACATGAGTGACTTCAATGGTGGTGTTACTTCAGTATCCGGTATCAA  
GCTTCANGGCAAAGCCTACGTCCCACCAAAGTTG

【図 3】

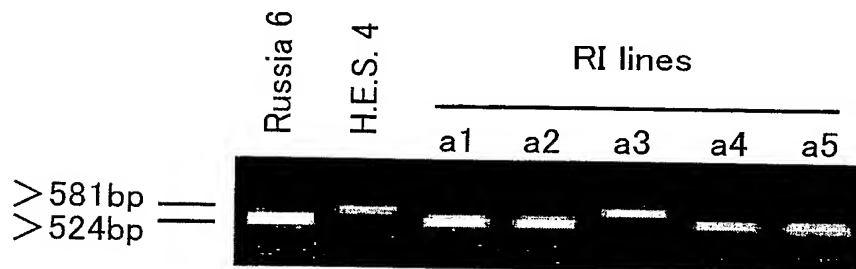


【図 4】

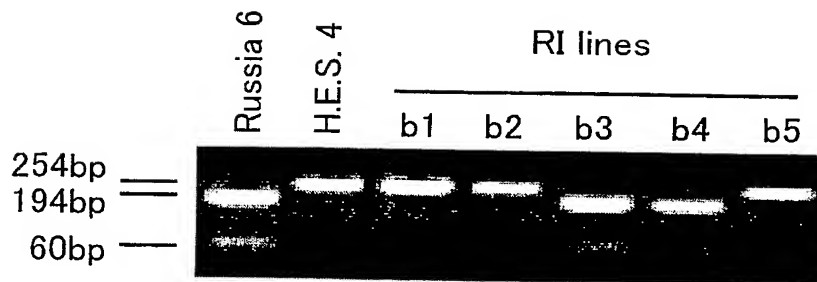
サイクル数	時間	温度
1	5分	94℃
30	0.5分	94℃
	0.5分	60℃
	1.5分	72℃
1	5分	72℃
	一定	4℃

【図 5】

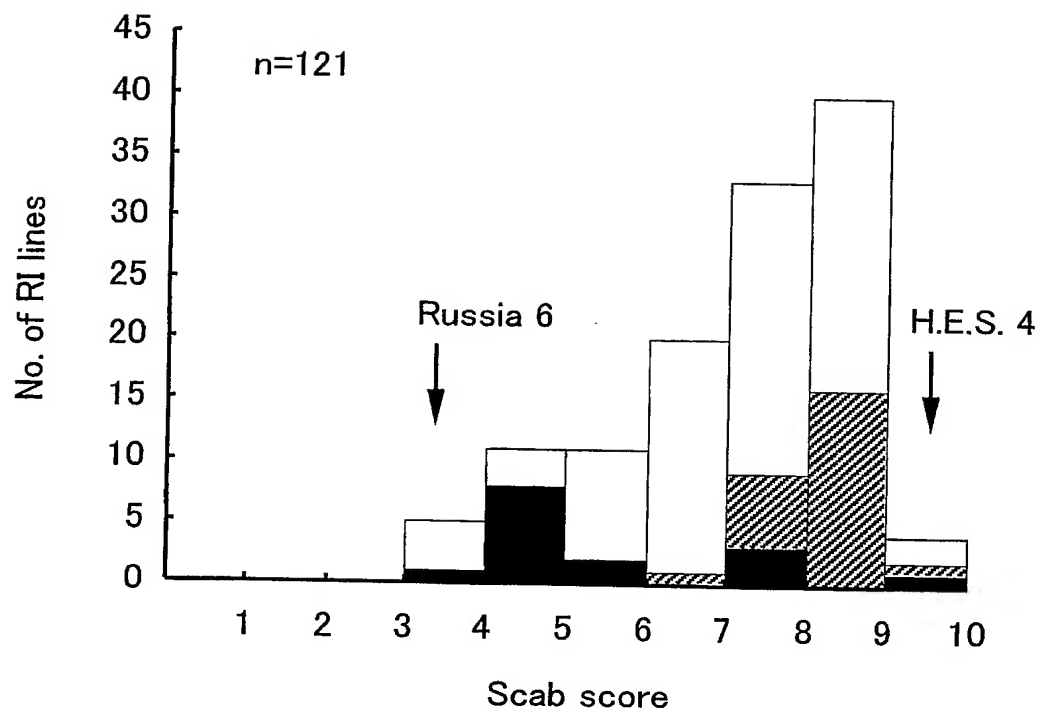
(a)



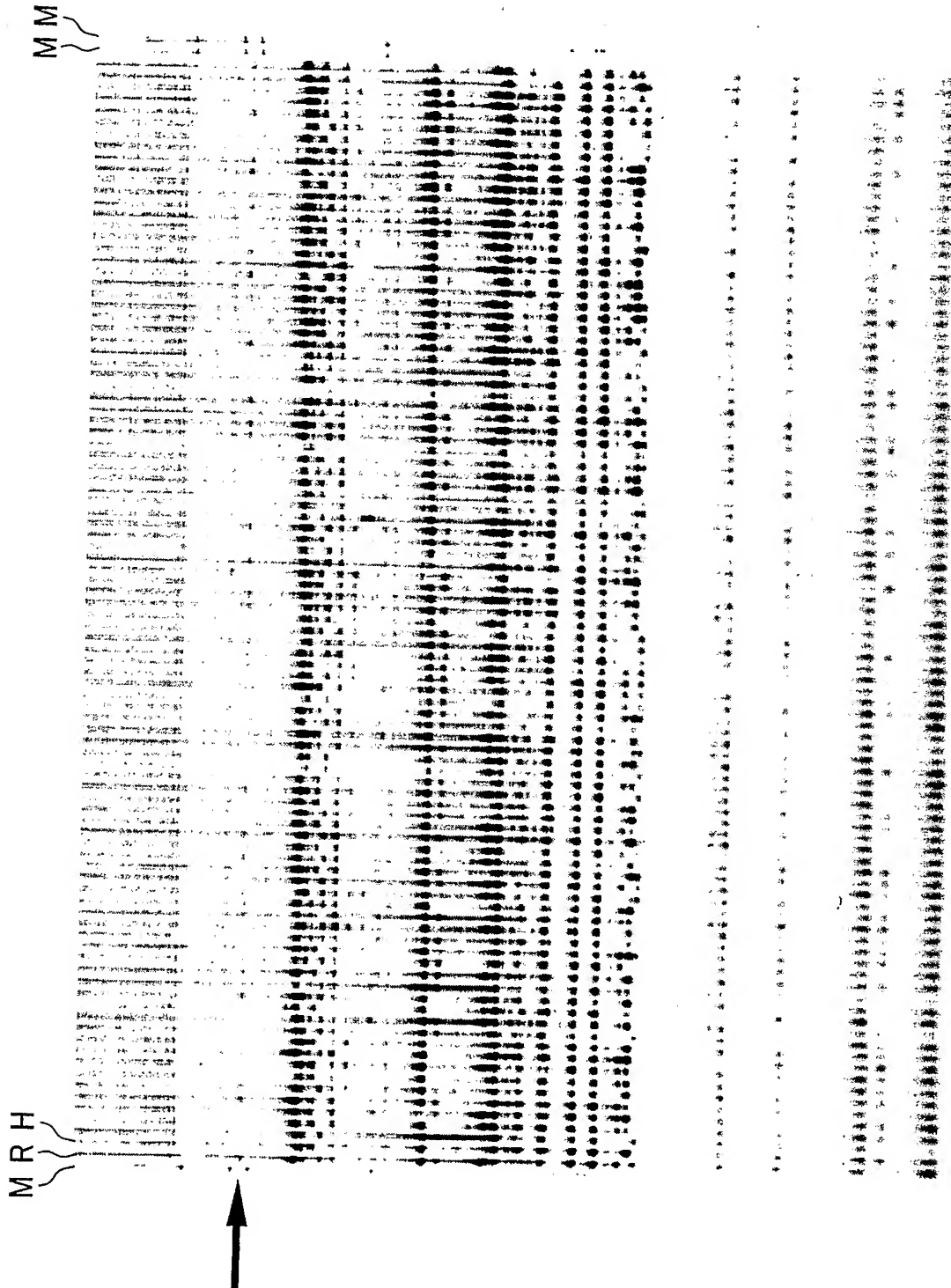
(b)



【図 6】



【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 オオムギのゲノム DNA 中に存在し、かつ赤カビ病抵抗性因子に連鎖する DNA マーカーの提供、およびその利用方法の代表例を提供することに関する。

【解決手段】 本発明者等は上記課題を解決すべく、オオムギの赤カビ病抵抗性に関する QTL 解析を行なった。その結果、赤カビ病抵抗性に関する新規の QTL を 2H 染色体上に 1 つ、5H 染色体上に 1 つ検出した。本発明者等が作成したオオムギの高密度連鎖地図の情報から、上記 QTL に存在する赤カビ病抵抗性因子に連鎖する DNA マーカー (MM 3 1 4、FM 6 7 7、FM 4 2 6、MM 1 0 5 7) を発見した。

【選択図】 図 1

出願人履歴情報

識別番号

[503360115]

1. 変更年月日

2003年10月 1日

[変更理由]

新規登録

住所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏名

独立行政法人 科学技術振興機構

2. 変更年月日

2004年 4月 1日

[変更理由]

名称変更

住所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏名

独立行政法人科学技術振興機構